Gh. Mohan

Fotografierea la microscop

Colecția FF FOTO FILM 35

Gh. Mohan

Fotografierea la microscop

(Microfotografia)

Colecția Foto-film

Editura tehnică
București

Scanned with OKEN Scanner

Redactor : arh. ILEANA NACU
Tehnoredactor : ELLY GORUN
Coperta seriei : VALENTIN VIȘAN

Bun de tipar : 10.02.1982. Coli de tipar : 8.
Planșe : 16. C.Z. : 77.035.

Tiparul executat sub comanda nr. 67
la I.P. „Filaret", str. Fabrica de chibrituri
nr. 9—11, București
Republica Socialistă România

Scanned with OKEN Scanner

Cuprins

Introducere 5

Capitolul I. **Microscopul optic sau fotonic** 7

1.1. Descrierea aparatului 7
1.1.1. Partea mecanică 7
1.1.2. Partea optică 11
1.2. Formarea imaginii și puterea de mărire a microscopului 20
1.3. Întreținerea microscopului 26
1.4. Funcționarea microscopului 26
1.5. Utilizarea microscopului optic sau fotonic 27
1.6. Tipuri de microscoape optice sau fotonice 28

Capitolul II. **Aparatura fotografică și materialele necesare** 30

2.1. Laboratorul fotografic 30
2.2. Aparatura de microfotografiere 32
2.2.1. Microfotografierea la microscopul universal de cercetare MC-1 34
2.2.2. Microfotografierea cu Microfotul D. 16. B (ROW) 38
2.2.3. Microfotografierea cu ajutorul tubului foto . . . 40
2.2.4. Alte dispozitive pentru fotografierea la microscop 43
2.3. Substanțe chimice utilizate în laboratorul fotografic . . 45
2.3.1. Conservarea materialelor fotografice 46
2.3.2. Manipularea materialelor fotografice 47

Capitolul III. **Prelucrarea materialelor fotografice** 48

3.1. Soluții revelatoare 48
3.2. Developarea ultrarapidă 51
3.3. Fixarea 54
3.4. Spălarea 55
3.5. Uscarea 55

Capitolul IV **Microfotografia** 57

4.1. Factorii fotografici 57
4.1.1. Sursa de lumină (iluminarea) 57

Scanned with OKEN Scanner

4.1.2. Alegerea sistemului optic 60
4.1.3. Filtrele pentru microfotografiere 61
4.1.4. Determinarea timpului de expunere 62
4.2. Grosismentul microfotografiei 64
4.3. Practica microfotografierii 66
4.4. Microfotografia în cîmp întunecat (cu fond negru) . . . 67
4.5. Microfotografia în contrast de fază 70
4.6. Microfotografia în lumină polarizată 75
4.7. Microfotografia în lumină fluorescentă 81
4.8. Microfotografia în infraroșu 86
4.9. Microfotografia în cazul luminii incidente 95
4.10. Microfotografia în culori 96

Capitolul V. **Microscopul electronic și electronofotografia** 110

Capitolul VI. **Tabele și rețete practice** 122

Bibliografie 128

Scanned with OKEN Scanner

Introducere

Astăzi, cînd științele moderne, biologice, geologice, medicale și agricole obțin informații de mare profunzime, pe baza unei aparaturi de cercetare ultramoleculară, în care primul loc îl ocupă microscopul electronic, s-ar părea că aparatura clasică de cercetare, din care face parte și microscopul optic (fotonic), nu și-ar mai avea rostul.

Așa ar fi, dacă nu am avea în vedere importanța imensă pe care continuă să o aibă microscopia optică (fotonică) în pregătirea și inițierea elevilor, studenților și chiar a tinerilor cercetători.

În acest sens, microscopia optică (fotonică), îmbunătățită permanent de tehnica modernă (microscopul cu contrast de fază, cu fluorescență, cu fond negru, cu raze ultraviolete). continuă să stea la baza inițierii și pregătirii practice a elevilor, studenților și tinerilor cercetători care funcționează în laboratoarele universitare și institutele de cercetări.

În studiile citologice, histologice, anatomo-patologice, genetice, microbiologice, fitopatologice, cristalografice, mineralografice și în alte domenii, microscopul optic (fotonic) reprezintă instrumentul principal de studiu.

Pentru reproducerea structurilor observate, se utilizează microfotografiile obținute la microscopul fotonic, în cîmp întunecat, prin contrast de fază, în lumină polarizată, cu raze infraroșii, microfotografii necesare ilustrării lucrărilor

Scanned with OKEN Scanner

și articolelor de specialitate, comunicărilor și conferințelor științifice și didactice.

Pentru relizarea lor se utilizează microscoape speciale, prevăzute cu dispozitive de fotografiat sau fotoaparate care se atașază la microscopul obișnuit de cercetare.

Lucrarea de față se adresează tuturor cercetătorilor din domeniul științelor biologice, medicale și agricole care doresc să cunoască tehnica de lucru necesară realizării unor micro-fotografii reușite.

AUTORUL

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul

I

Microscopul optic sau fotonic

O condiție esențială pentru obținerea unor microfotografii de bună calitate este aceea de a cunoaște cît mai amănunțit aparatura folosită în acest scop.

1.1. Descrierea aparatului

Microscopul optic sau fotonic este un aparat optic care permite mărirea datorită unei combinații de lentile, cu ajutorul cărora se obține o imagine mult mărită, virtuală și răsturnată.

Microscopul optic este alcătuit din două părți: partea mecanică și partea optică (fig. 1).

1.1.1. Partea mecanică

Este formată din stativul microscopului (piciorul microscopului), care are forma unei potcoave; din partea centrală a acestuia se ridică un stativ metalic pe care sînt fixate *platina* (măsuța port-obiect) și *tubul microscopic* (tubul port-ocular).

Stativul metalic sau mînerul microscopului are rol în susținerea tubului microscopic, care poate fi vertical sau curbat, în funcție de tipul microscopului, și poate fi orientat în unele cazuri înainte sau înapoi, în funcție de cerințele observării.

Scanned with OKEN Scanner

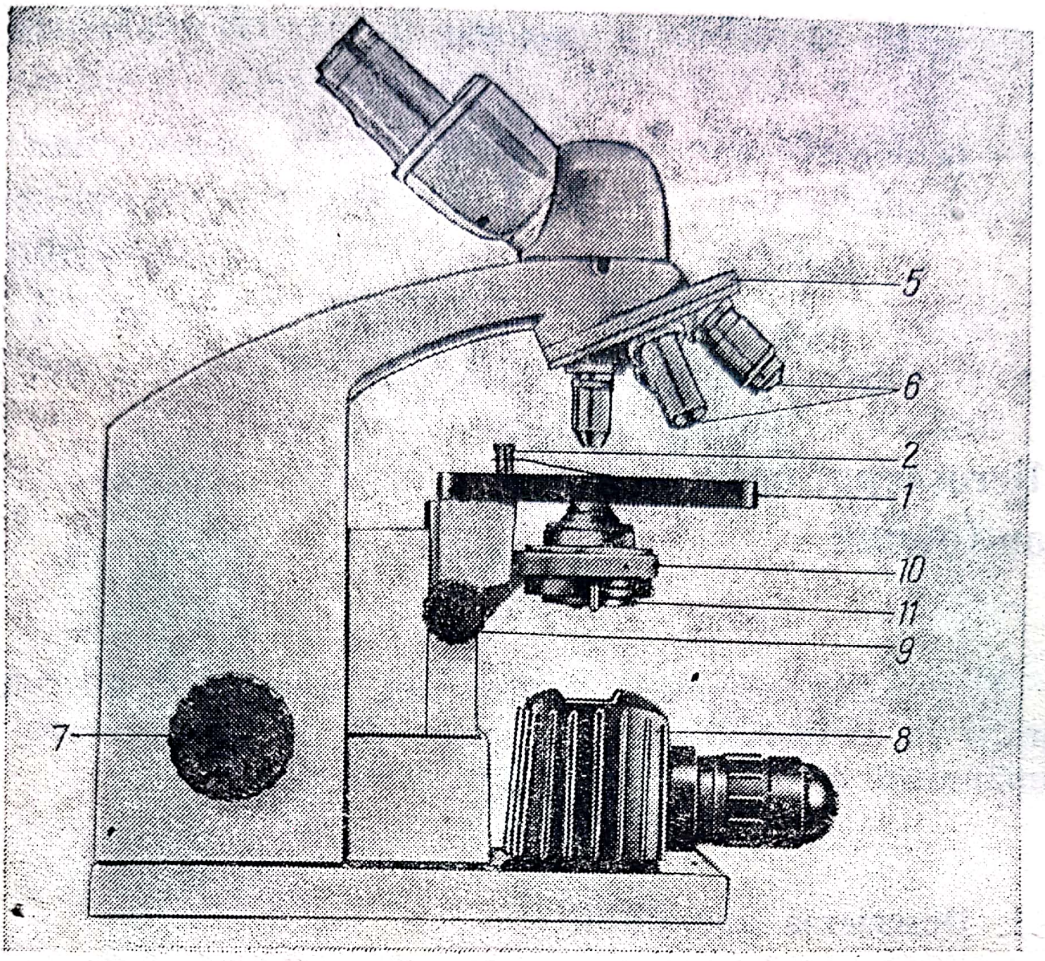


Fig. 1. Părțile componente ale microscopului optic (fotonic):
1 — platină; *2* — cavaleri; *3* — tubul microscopului; *4* — ocular; *5* — revolver; *6* — obiective; *7* — viza macrometrică; *8* — lampă pentru iluminare; *9* — viza condensatorului; *10* — condensatorul; *11* — diafragma iris.

Platina (măsuța port-obiect) (fig. *2*, *a*, *b*, *c*, *d*) poate fi rotundă sau pătrată, prevăzută în partea centrală cu o deschidere circulară sau alungită prin care pătrund razele de lumină reflectate de oglinda microscopului și trimise prin condensor la obiect.

La microscoapele cu platină pătrată sau dreptunghiulară, în spatele deschiderii și pe una dintre laturile măsuței (platinei) se află cîte o bară metalică, gradată în centimetri, cea din spatele deschiderii fiind lungă aproape cît latura respectivă a platinei, iar cea laterală mai scurtă.

În lungul lor se mișcă cîte un vernier împărțit în 10 diviziuni, egale cu 9 diviziuni de pe barele de metal. Cu ajutorul vernierelor și al gradațiilor de pe barele metalice se poate stabili poziția sectorului ales din preparatul micro-

Scanned with OKEN Scanner

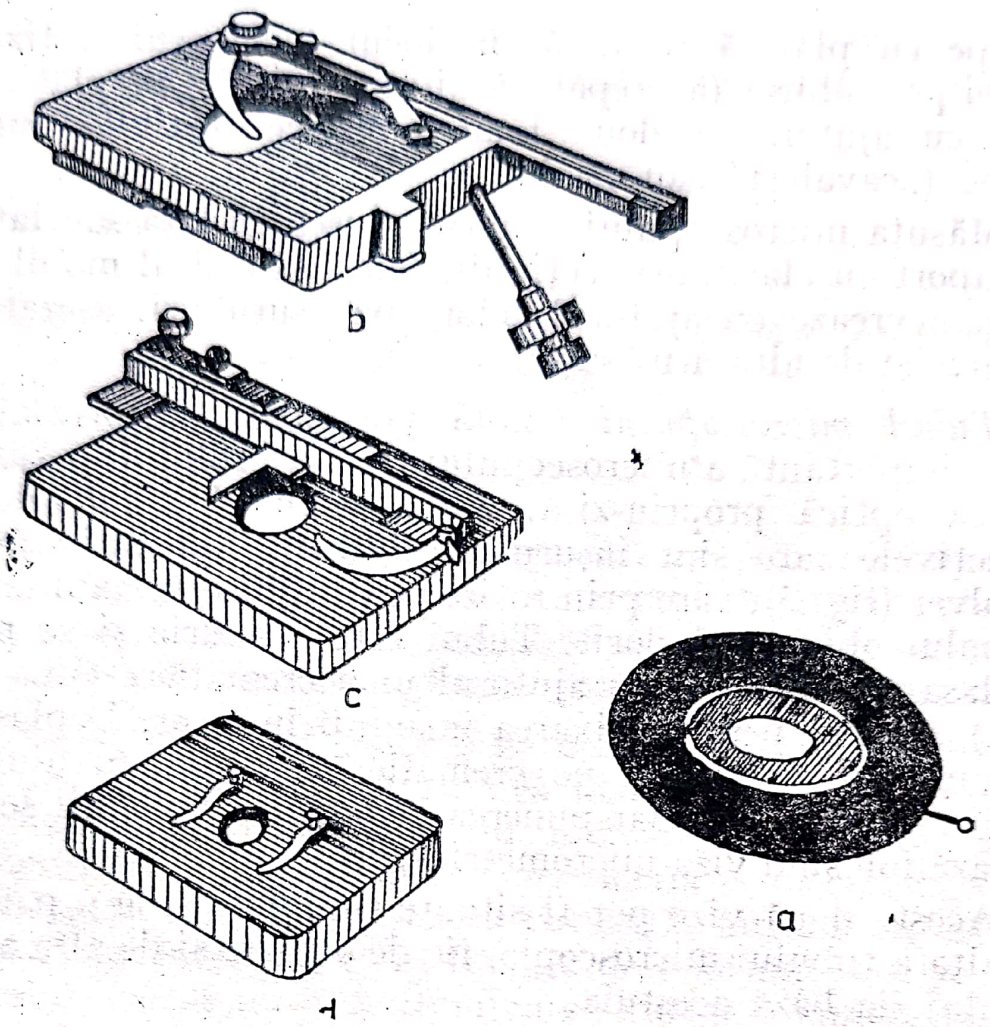


Fig. 2. Tipuri de platine microscopice:
a — platină sferică universală; *b* — platină cu vernier gradat; *c* — platină combinată cu cărucior; *d* — platină fixă cu cavaleri".

scopic. În fața barei metalice mai mari se află două lame metalice flexibile între care se fixează lama port-obiect și care se deplasează spre dreapta și stînga cu ajutorul a două butoane. Prin mișcarea lamei cu preparatul este posibilă examinarea acestuia pe o suprafață cît mai mare precum și efectuarea unor măsurători microscopice.

La tipurile de microscoape mai vechi, ca de exemplu la cele cu platină rotundă, deplasarea lamei port-obiect pe platină se face cu ajutorul unui dispozitiv numit „cărucior". Acesta este alcătuit dintr-o bază orizontală și două bare laterale, între care se fixează lama port-obiect (preparatul microscopic), iar mișcarea lamei pe platină se face de asemenea cu ajutorul a două șuruburi laterale. La aceste micro-

Scanned with OKEN Scanner

scoape cu platină rotundă, în locul căruciorului, fixarea lamei port-obiect (a preparatului microscopic) pe platină se face cu ajutorul a două lame metalice flexibile numite cleme („cavaleri" sau „valeți").

Măsuța microscopului se poate mișca în față sau lateral în raport cu claritatea secțiunii, folosind cadrul mobil care se manevrează cu ajutorul celor două șuruburi, așezate de o parte și de alta a măsuței.

Tubul microscopului (tubul port-ocular) reprezintă o parte importantă a microscopului care are rolul de a susține partea optică propriu-zisă, adică ocularul (ocularele) și obiectivele care sînt înșurubate într-un dispozitiv numit revolver (fig. 3), care prin rotire poate aduce în axul microscopului obiectivul dorit. Tubul este cilindric și se poate deplasa pe verticală cu ajutorul unei cremaliere (șină dințată), ceea ce permite fixarea imaginii în focar. Deplasarea tubului microscopului pe cremalieră se face cu ajutorul vizei macrometrice, iar punerea la punct a imaginii se realizează folosind viza micrometrică.

Aceste două vize pot fi situate fie lateral, de o parte și de alta a tubului microscopic, fie de o parte și de alta a stativului, la baza acestuia.

Tuburile microscopului pot fi: drepte monoculare, înclinate monoculare și binoculare drepte sau înclinate (fig. 4).

În cazul microscoapelor binoculare, distanța dintre cele două tuburi port-ocular poate fi reglată în funcție de distanța interpupilară a observatorului. În plus, unul dintre cele două

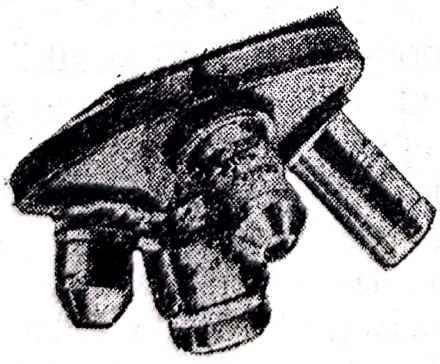


Fig. 3. Revolver cu patru obiective.

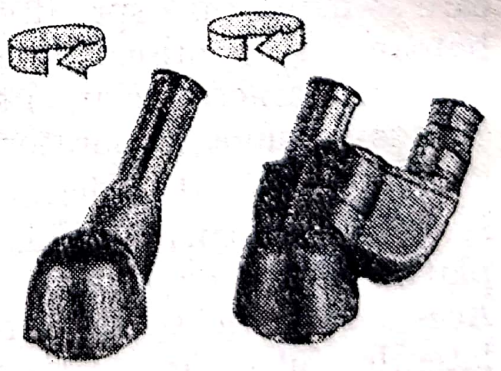


Fig. 4. Tuburi microscopice înclinate:
a — monocular; *b* — binocular.

Scanned with OKEN Scanner

tuburi are un dispozitiv de punere la punct folosit în cazul în care între cei doi ochi ai observatorului există o diferență dioptrică.

1.1.2. Partea optică

Partea optică a microscopului este formată din: sistemul de iluminare și sistemul optic propriu-zis.

Sistemul de iluminare

Intensitatea și calitatea luminii are un rol important în stabilirea puterii de rezolvare a unui microscop. Acestea sînt controlate și reglate de sistemul de iluminare, format din: sursa de lumină, oglindă, condensor și diafragma iris.

Sursa de lumină poate fi naturală (solară) sau artificială (un bec cu incandescență). Cea mai avantajoasă iluminare a preparatului pentru studiul microscopic și pentru microfotografiere este iluminarea artificială — electrică. Nu se recomandă de loc iluminarea naturală, întrucît ea este variabilă ca intensitate, în funcție de anotimp, oră și starea cerului. Drept sursă de iluminare se alege o lampă fixă care dă o lumină albă și uniformă.

Iluminarea ideală este dată de o lampă cu filament punctiform, alimentată la joasă tensiune (6 V, 5 V). Camera este montată într-un tub metalic, acoperit la capăt cu un geam mat, și o diafragmă de tip iris, care ne permite să îngustăm sau să mărim diametrul cîmpului întunecat, și cu un transformator în trepte, folosite pentru analizele în cîmp închis, deschis și contrast, cu toate scările de mărire pentru microfotografiere și proiecție (fig. *5*, *a*, *b*).

Microscoapele cele mai moderne prezintă un sistem de iluminare situat în talpa microscopului care menține o lumină constantă ce este proiectată direct în condensator.

Oglinda (plan-concavă) este fixată sub condensator (la unele microscoape înglobată în talpă) și are rolul de a capta razele luminoase, emise de izvorul luminos, și de a le proiecta sub forma unui con luminos pe lentilele condensatorului.

Scanned with OKEN Scanner

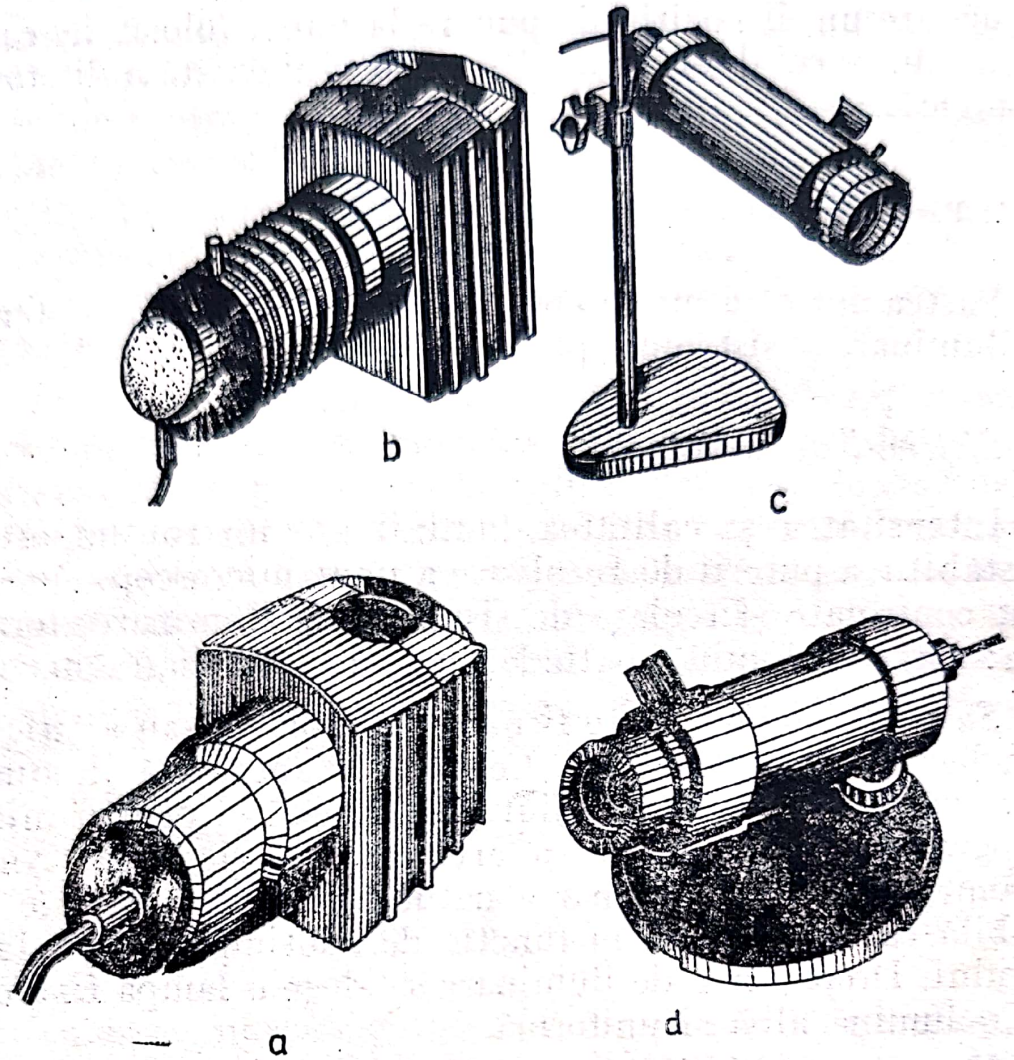


Fig. 5. Tipuri de lămpi de microscopat:
a — lampă de 25 w cu cîmp deschis; *b* — lampă de 15 w cu transformator în trepte cu cîmp deschis și contrast; *c*, *d* — lămpi reglabile cu diafragmă.

Fața plană a oglinzii se folosește cînd izvorul luminos este suficient de puternic și îndepărtat, iar cea concavă numai în situația în care lumina este slabă și apropiată.

*Condensorul** (fig. 1 și 6) se află situat sub platina microscopului și poate fi apropiat sau îndepărtat de aceasta prin intermediul unui șurub.

El reprezintă un sistem optic format din 2—3 lentile convergente care au rolul de a concentra asupra obiectivului razele de lumină reflectate de oglindă.

De condensor este fixată diafragma-iris.

* Mai este cunoscut și sub denumirea de *condensator*.

Scanned with OKEN Scanner

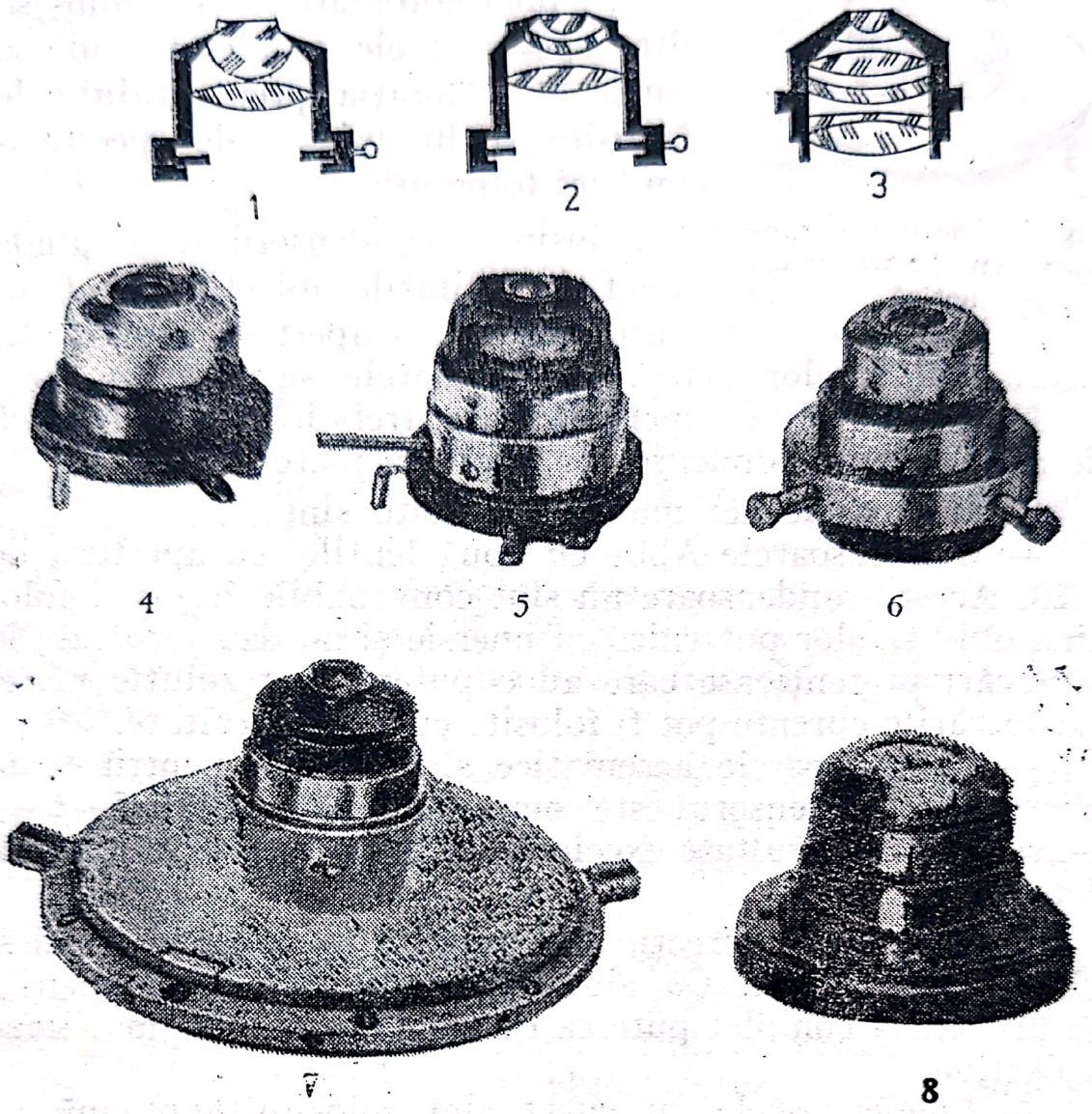


Fig. 6. Tipuri de condensatoare:

1 — condensator de tip Abbe (apertura 1,20); *2* — condensator tip Abbe modificat (apertura 1,30); *3* — condensator acromatic cu imersie (apertura 1,40); *4* — condensator cu două lentile (apertura 1,25) cu diafragmă și compartiment pentru filtre; *5* — condensator cu două lentile (apertura 0,90) cu lentilă frontală mixabilă; *6* — condensator de imersie pentru cîmp mare (apertura 1,18/1,42); *7* — condensator de contrast cu 6 diafragme inel și diafragmă iris de deschidere cu cîmp deschis, cîmp închis, contrast de fază, contrast anoptral; *8* — condensator universal pentru micro scoape didactice.

disc de sticlă alb-lăptoasă sau albastră, numit filtru, necesar pentru anumite examene.

În mod obișnuit se folosesc următoarele tipuri de filtre: mate (alb-lăptoase), care dau o lumină difuză și colorate.

Filtrul albastru este folosit împreună cu surse de lumină artificială, absorbind o parte din razele roșii.

De asemenea, la condensor, între oglindă și lentile, este anexată o piesă metalică rotundă pe care se pune un

Scanned with OKEN Scanner

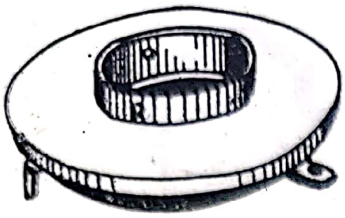


Fig. 7. Diafragme centrate cu fixare magnetică.

La microfotografiere se folosesc filtre speciale; ele se aleg ținîndu-se seama de coloraţia preparatului, de intensitatea luminii și de specificul emulsiei fotografice.

Folosirea condensorului depinde direct de calităţile obiectivului. Condensoarele au o apertură redusă. În cazul obiectivelor slabe, condensoarele se diafragmează.

La un obiectiv cu apertură mare, trebuie să se folosească de asemenea un condensor cu apertură mare.

Condensoarele cel mai des folosite sînt:

— Condensoarele Abbe cu două lentile, cu apertura de 1,20. Aceste condensoare nu sînt convenabile în cazul folosirii obiectivelor puternice cu imersie și nu dau rezultate la încercări pretenţioase care au o putere de rezoluţie mare. La lucrările curente pot fi folosite cu bune rezultate.

— Condensoarele acromatice sînt corecte pentru toate aberaţiile. Condensorul este compus din garnituri de 5—6—7 lentile; el dă rezultate excelente în lucrări fine și în microfotografie.

Avînd o bună corecţie este permisă folosirea lui cu deschiderea completă. Cu ajutorul acestui tip de condensor se utilizează complet puterea de rezoluţie a celor mai bune obiective.

— Condensoarele cu cuarţ sînt folosite împreună cu obiectivele monocromatice pentru fotografierea cu raze ultraviolete.

— Diafragma iris (fig. 7), este formată din mai multe lame subţiri de oţel și se fixează de condensor. Prin apropierea sau depărtarea acestor lame cu ajutorul unei mici manete se creează o deschidere mai mare sau mai mică care reglează fascicolul de lumină ce trece prin condensor, permiţînd selectarea razelor de lumină, înlăturînd razele laterale care determină aberaţii în formarea imaginii.

Sistemul optic propriu-zis

Reprezintă partea cea mai importantă a unui microscop. Calitatea imaginii depinde în primul rînd de performanţele

Scanned with OKEN Scanner

tehnice ale sistemului optic care este format din: obiective și oculare.

Obiectivul microscopului este format din mai multe lentile convergente fixate la capătul unui tub cilindric, filetat, ce se înșurubează în revolver. Fiecare revolver prezintă 4—5 orificii în care pot fi înșurubate tot atîtea obiective cu putere de mărire și apertură numerică foarte diferită care pot fi schimbate după necesitate prin rotirea revolverului.

În complexul optic al obiectivului, prima sau primele grupe de lentile asigură puterea măritoare a obiectivelor, iar restul grupelor de lentile asigură corecțiile aberațiilor sferice și cromatice.

Obiectivele uscate sînt obiective mici, cu putere de mărire de 10 X, 20 X, 40 X, 60 X, numite astfel deoarece mediul care se interpune între lentila frontală a obiectivului și preparat este aerul.

— Obiectivele umede (cu imersie) sînt obiectivele mari, cu putere de mărire maximă (90 X, 120 X), și la ele se folosește un lichid intercalat între lentila frontală a obiectivului și preparat.

Prin folosirea unui lichid de imersie cum ar fi uleiul de cedru 1,515; unisol 1,52; ulei de parafină 1,47; ulei de ricin 1,48; glicerină apoasă, tot spațiul dintre preparatul microscopic și lentila frontală a obiectivului devine omogen în ceea ce privește indicele de refracție.

Se știe că atunci cînd o rază de lumină trece printr-un mediu mai dens într-un mediu mai puțin dens, este reflectată depărtîndu-se de normală. Raza de lumină care străbate preparatul microscopic, după ce trece prin lama de sticlă, ajunge în stratul de aer care desparte preparatul de obiectiv. Prin fenomenul de refracție, o parte din razele reflectate nu mai pot pătrunde în obiectiv. Din această cauză, imaginea rezultată este neclară și slab luminată.

Pentru a face ca întregul fascicol de raze care luminează preparatul să intre în obiectiv, se interpune între acesta și preparat un strat de ulei de cedru (sau alt lichid de imersie), care are un indice de refracție egal cu cel al sticlei.

Scanned with OKEN Scanner

În acest fel razele de lumină nu mai suferă fenomenul de refracție, intrînd în obiectiv, unde formează o imagine clară, luminoasă. Lichidele de imersie folosite trebuie să aibă, în afara unui indice de refracție potrivit, și alte însușiri ca: să nu fie volatile, să nu decoloreze preparatele, să nu atace partea metalică a obiectivului, să nu dizolve montura lentilelor etc.

Uleiul de cedru sau alt lichid de imersie folosit în microscopie se păstrează în sticluțe bine astupate, pentru a nu se usca sau a se îngroșa, picătura necesară se ia cu o baghetă subțire de sticlă, în așa fel încît să nu cadă ulei pe platina microscopului. Dacă totuși aceasta se întîmplă, picătura se șterge cu degetul sau cu o bucată de tifon înmuiată în xilol.

Capacitatea unui obiectiv de a reda distinct conturul unui obiect este influențată la sistemele optice simple, de două abateri de la schema normală de formare a imaginii și anume: aberația sferică și aberația cromatică.

Datorită lor, imaginea formată de o lentilă simplă cu suprafețe sferice prezintă două defecte: imaginea unui punct apare ca un cerc (aberația sferică); imaginea prezintă mai multe culori care nu există în microscop (aberație cromatică).

— Aberația sferică (fig. 8) apare datorită faptului că periferia lentilei refractă lumina mai mult decît porțiunea ei centrală. Ca urmare, razele periferice focalizează pe ax la o distanță mai scurtă de lentilă decît cele centrale, iar imaginea este deformată.

Lentilele la care s-a făcut corecția acestei aberații sînt numite aplanatice (aplanate).

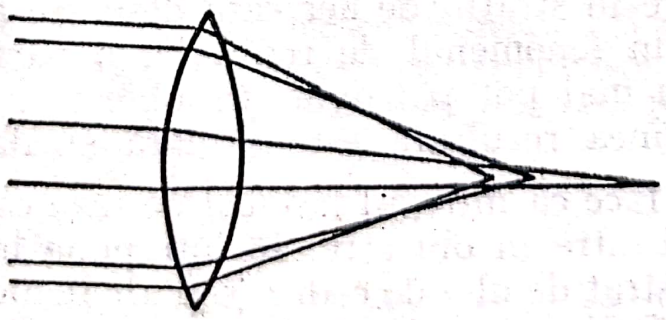


Fig. 8. Aberația sferică a lentilelor.

Scanned with OKEN Scanner

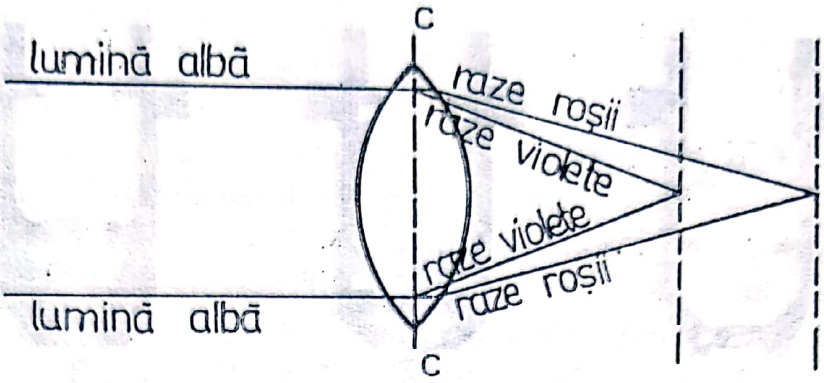


Fig. 9. Aberația cromatică a lentilelor.

— Aberația cromatică (fig. 9) este produsă de faptul că razele de lumină albă refractate prin lentile sînt dispersate în culorile lor componente și formează un spectru.

Razele albastre sînt refractate mai mult și ajung într-un focar mai apropiat de lentilă decît cele roșii. Ca urmare, diferitele culori componente nu ajung în același focar și de aceea nu se poate combina pentru a forma culoarea albă. Ca rezultat, imaginea este difuză, în culori, iar conturul apare confuz.

Aceste defecte au fost corectate prin construirea și utilizarea obiectivelor speciale, acromatice, apocromatice, formate din mai multe lentile.

După gradul de corectare al aberațiilor se disting următoarele tipuri de obiective (fig. 10).

— Obiective acromatice, cu ajutorul cărora se realizează corecția aberațiilor cromatice pentru două radiații ale spectrului vizibil (galben sau verde-albastru), dar numai pentru zona centrală a obiectivului.

Obiectivele acromatice uscate cu apertură maximă de 0,85 dau rezultate bune la măriri slabe, dar nu dau rezultate cînd măririle proprii ale obiectivelor depășesc 60 X.

Sînt practice obiectivele acromatice cu apertura de 1,25, cu imersie în apă distilată. Obiectivele acromatice prezintă fenomene de curbură foarte supărătoare pentru observații. Pentru eliminarea acestor defecțiuni este necesar să se pună la punct microscopul succesiv pentru fiecare zonă, de la centru spre periferie. Acest fenomen este mai accentuat la obiectivele cu imersie.

Scanned with OKEN Scanner

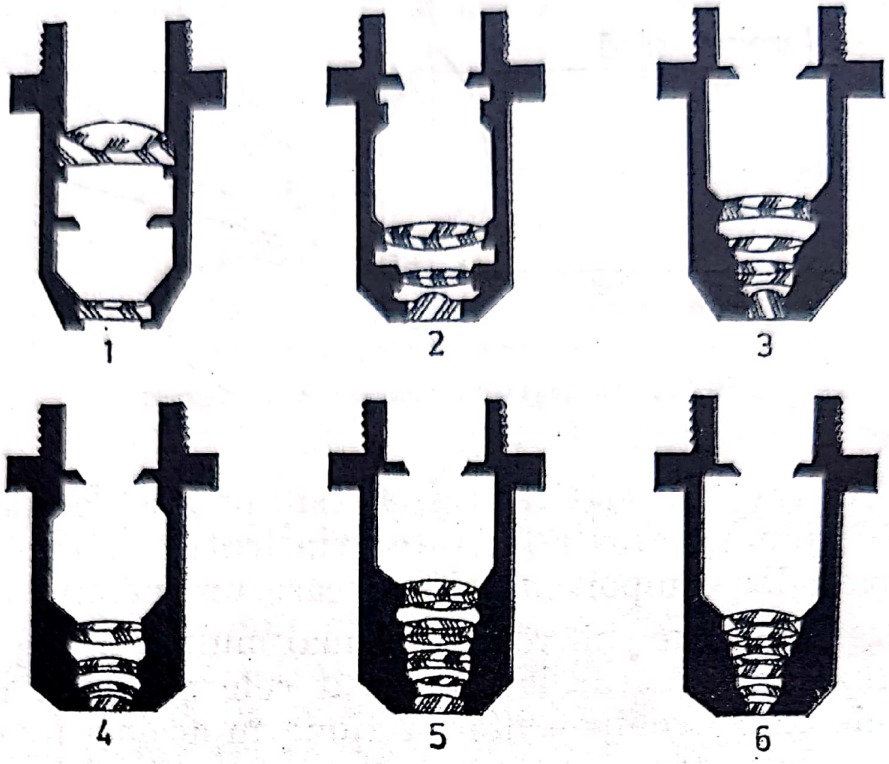


Fig. 10. Tipuri de obiective:
1 — acromat nr. 2 (6—8 X); *2* — acromat nr. 6 (40—45 X); *3* — semiapocromat; *4* — acromat cu imersie; *5* — apocromat cu imersie, apertura 1,40; *6* — apocromat cu imersie, 120 X, apertura 1,30.

— Obiectivele semiapocromatice permit o corecție bună a aberațiilor cromatice și dau o imagine foarte luminoasă. Cele mai bune au apertura egală cu 1,32, suportînd măriri totale pînă la 1 500 X.

— Obiectivele apocromatice dau imagini luminoase. Aberația de sfericitate nefiind corectată aici, obiectivul apocromatic se folosește în mod obligatoriu cu un ocular compensator avînd aceeași aberație, însă de sens invers. De asemenea, este importantă și curbura cîmpului. Totuși aceste obiective dau rezultate bune în microfotografiere.

— Obiectivele monocromatice sînt obiective confecționate din cuarț. Ele sînt folosite în cazul microfotografierii în raze ultraviolete.

Obiectivele monocromatice cu imersie folosesc drept lichid un amestec de apă distilată și glicerină. Lucrînd în ultraviolet, au o mare putere de rezoluție.

Scanned with OKEN Scanner

— Obiectivele pancromatice sînt avantajoase în cazul cîmpurilor plane. Se folosesc numai pentru cercetarea secțiunilor subțiri (I. Goldhaar).

— Obiectivele pentru contrast de fază sînt sisteme acromatice sau semiacromatice prevăzute cu o lamă sfert de undă, prezentînd un inel defazat și absorbant. Oricare ar fi tipul de obiectiv utilizat, menirea sa în sistemul optic al microscopului este de a da o imagine mult mărită, reală și răsturnată a obiectului (preparatului), punînd în evidență detalii structurale inaccesibile pentru ochiul omului.

Ocularul este o parte componentă a sistemului optic al microscopului care servește la mărirea imaginii dată de obiectiv, fără să pună în evidență detalii de structură, el transformînd imaginea reală într-o imagine virtuală.

El este alcătuit din două lentile plan-convexe fixate într-un cilindru metalic, care este introdus în partea superioară a tubului microscopic.

Fiecare ocular este notat cu un număr (2 X, 7 X, 20 X, 15 X, 20 X, 25 X, 30 X) care indică puterea de mărire. Se cunosc pînă în prezent 5 tipuri de oculare (fig. 11).

— Oculare Huyghens, întrebuințate în mod curent, care sînt compuse din două lentile plan-convexe (o lentilă de ochi și una de cîmp), cu fețele plane în sus și separate de un ecran inelar.

Puterea lor de mărire variază între 4 și 12 X. Acestea se asociază de obicei cu obiectivele acromatice.

— Oculare compensatoare sînt astfel construite încît dau măriri mai mari pentru lumina roșie decît pentru lu-

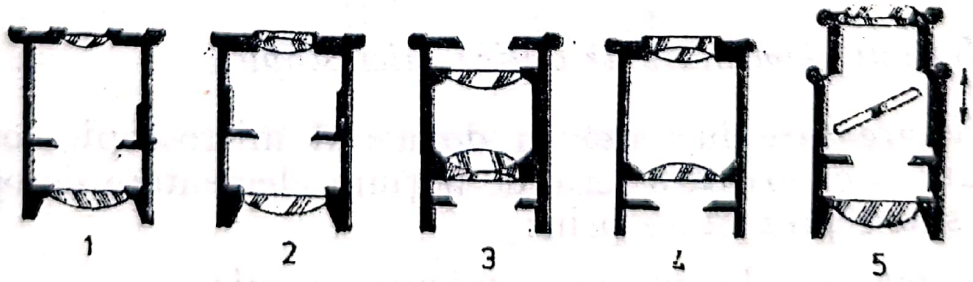


Fig. 11. Tipuri de oculare:
1 — ocular negativ Huygens; *2* — ocular negativ acromatic (periplan, plan-cromatic); *3* — ocular pozitiv ortoscopic (de cîmp mare); *4* — ocular tip Kellner (micrometric); *5* — ocular fotografic (proiectiv) cu reglare.

Scanned with OKEN Scanner

mina violetă, în scopul de a compensa defectul pe care-l au obiectivele acromatice puternice.

Drept semn distinctiv, poartă gravată pe montura lor litera „K" sau se scrie în întregime „ocular compensator". Aceste oculare nu le utilizăm decît în cazul obiectivelor apocromatice și semiapocromatice.

— Ocularele periplane și semiacromatice sînt veritabile oculare universale.

— Ocularele ortoscopice sînt destinate corectării acromatelor de măriri mici și medii.

— Ocularele proiective (foto-oculare) sînt oculare speciale pentru microfotografiere. Denumirea lor variază după fabricație: oculare homale, periplanmetrice, complanmetrice, foto-oculare etc.

1.2. Formarea imaginii și puterea de mărire a microscopului

1.2.1. Formarea imaginii

Imaginea formată de microscopul fotonic este o imagine de interferență între razele directe și cele difractate de obiect (preparat).

Ocularul care acționează ca o lupă preia această imagine și o transformă într-o imagine virtuală, dreaptă și mărită în raport cu prima imagine. În felul acesta, imaginea finală dată de microscopul fotonic este virtuală, răsturnată și mult mărită în raport cu obiectul (fig. 12 a,).

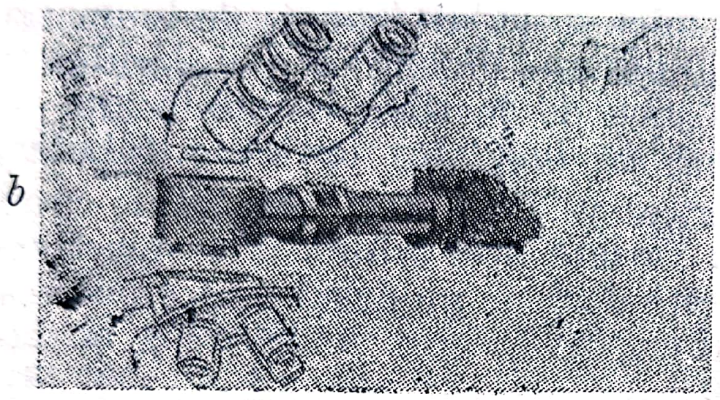
Noțiuni elementare de optică microscopică

Fiecare care lucrează în domeniul microscopiei optice trebuie să cunoască o serie de noțiuni elementare de optică care sînt reprezentate prin:

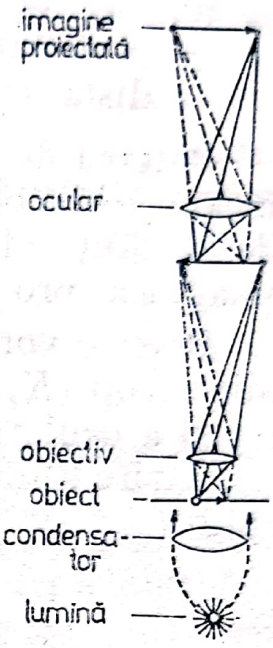
— puterea de mărire a microscopului;
— grosismentul microscopului;
— apertura numerică;

Scanned with OKEN Scanner

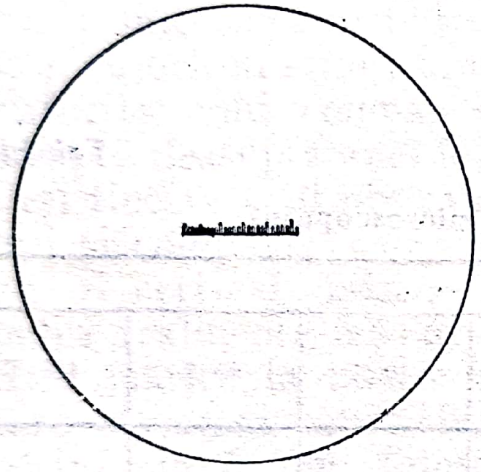
Fig. 12. Formarea imaginii la microscopul optic (fotonic) (*a*), cameră clară (*b*), micrometrul ocular (*c*) și micrometrul obiectiv (*d*)



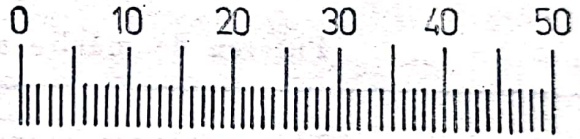
b

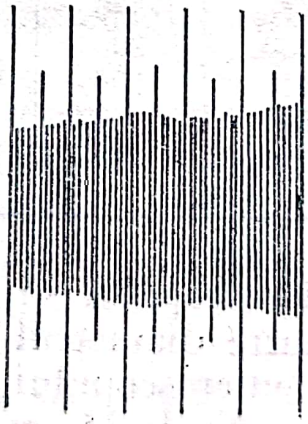


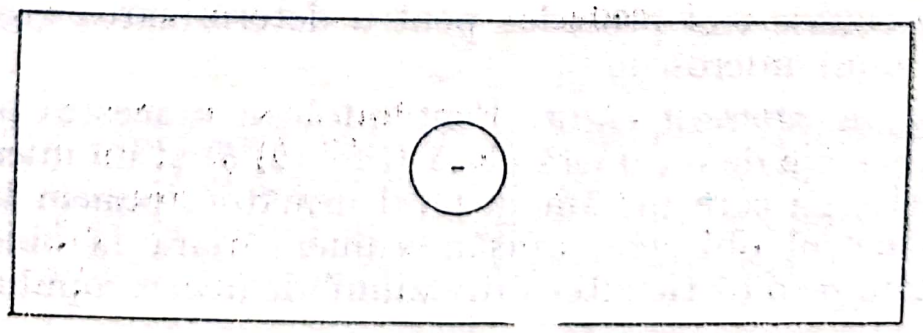
a



c







d

Scanned with OKEN Scanner

— puterea de rezoluție (separatoare);
— profunzimea imaginii;
— distanța frontală.

Puterea de mărire a microscopului depinde de lungimea focală a obiectivului, de puterea de mărire a ocularului și de distanța dintre sistemul de lentile al obiectivului și imaginea produsă, adică de lungimea optică a tubului.

Practic vorbind, mărirea totală a unei imagini de către microscop (K), poate fi variată prin schimbarea obiectivelor și a ocularelor. Ea este dată de produsul dintre puterea de mărire a obiectivului (n_{ob}) și puterea de mărire a ocularului (n_{oc}) (v. tabelul 1):

$$K = n_{ob} \cdot n_{oc}$$

Tabelul 1

Puterea de mărire a microscopului

Oculare	Obiective				
	10 X	20 X	40 X	90 X	120 X
7 X	70	140	280	630	840
10 X	100	200	400	900	1 200
15 X	150	300	600	1 350	1 800
20 X	200	400	800	1 800	2 400
30 X	300	600	1 200	2 700	3 600

Grosismentul microscopului se calculează stabilind raportul care există între diametrul obiectului de studiat și diametrul imaginii microscopului, la distanța minimă a vederii normale care este de 25 cm.

Se cunosc trei procedee pentru determinarea grosismentului unui microscop:

— *Cu cameara clară*. Pentru folosirea acestui procedeu avem nevoie de o cameră clară (fig. 12, *b*) și un micrometru obiectiv, cu care lucrăm în felul următor: punem la punct micrometrul obiectiv, atașăm camera clară la obiectiv și desenăm pe o hîrtie cîteva diviziuni ale microscopului obiec-

Scanned with OKEN Scanner

tiv. Desenul obținut reprezintă sutimile de milimetru ale micrometrului obiectiv, mărite de combinarea ocularo-obiectivă întrebuințată la microscopul nostru. Apoi facem raportul între mărimea intervalului cuprins între două diviziuni vecine desenate și o sutime de milimetru și obținem grosismentul microscopului. Exemplu: presupunem că intervalul dintre două diviziuni de pe desen măsurate cu compasul este de 2 mm. Grosismentul va fi:

$$2 : \frac{1}{100} = 200 \text{ ori.}$$

— *Procedeul dublei vederi.* În acest procedeu folosim numai un micrometru obiectiv și lucrăm astfel: punem la punct micrometrul obiectiv și ne uităm la el prin microscop cu ochiul stîng; în același timp privim cu ochiul drept vîrfurile unui compas deschis pe care-l ținem cu mîna dreaptă deasupra unei foi de hîrtie, așezată lîngă microscop. Deși fiecare ochi observă două obiecte deosebite, micrometrul și compasul, cele două imagini se suprapun în centrul vizual cortical, întrucît lucrurile se petrec ca și cum am putea realmente măsura cu compasul diviziunile micrometrice mărite la microscop. Dacă vîrfurile compasului cu care măsurăm intervalul dintre două diviziuni sînt îndepărtate la 2 mm, folosind același calcul ca în procedeul anterior, obținem grosismentul microscopului egal cu 200.

Cu ajutorul a două micrometre (fig. 12, *c* și *d*). Așezăm micrometrul ocular, punem la punct micrometrul obiectiv și vedem cîte diviziuni ale micrometrului ocular corespund unei diviziuni micrometrice obiective. Să presupunem că trei diviziuni oculare, adică 3 mm, sînt egale cu o diviziune obiectivă $\left(\frac{1}{100} \text{ de mm}\right)$.

Apertura numerică (AN) a fost definită de către Abbe ca fiind sinusul jumătății unghiului de deschidere a obiectivului:

$$AN = n \sin \alpha$$

unde: n reprezintă indicele de refracție al lichidului de imersie utilizat, care este de 1,51 la uleiul de cedru, 1,47 la uleiul de parafină, 1,48 la uleiul de ricin; α este jumătatea aperturii unghiulare.

Scanned with OKEN Scanner

Puterea de rezoluție (separatoare). Numărul detaliilor de structură și precizia cu care pot fi evidențiate într-un obiect depind de puterea de rezoluție sau de separare a sistemului optic (ochi, microscop) cu care sînt examinate, adică de capacitatea acestuia de a da imaginile distincte a două puncte adiacente.

Puterea de rezoluție nu trebuie confundată cu vizibilitatea, deoarece un obiect poate fi vizibil fără să i se vadă detaliile de structură.

Puterea de rezoluție sau de separare a unui sistem optic este reprezentată de cea mai mică distanță la care două particule sau linii separate pot fi văzute individualizat, adică formînd imagini distincte pentru ochi sau placa fotografică. Această distanță (d) este calculată de raportul dintre lungimea de undă a razelor luminoase folosite (λ) și constanta $n \sin \alpha$, care reprezintă apertura numerică a obiectivului folosit.

În această constantă, n reprezintă indicele de refracție al mediului dintre obiect și lentila obiectiv, iar $\alpha = 1/2$ din apertura unghiulară a obiectivului: $d = \frac{\lambda}{n \sin \alpha}$.

De exemplu, admițînd că lungimea de undă medie a luminii albe este de 5 500 A (0,55 μ), cel mai mic detaliu de structură care poate fi deosebit la această lumină cu obiectivul 40 ($AN = 0{,}65$), este $\frac{0{,}55}{0{,}65}$ $\mu = 0{,}85$ μ. Puterea de rezoluție a unui obiectiv poate fi îmbunătățită prin:

— mărirea unghiului de deschidere pînă la 143° (apertura numerică 0,95). Pentru $\lambda = 0{,}55$ μ, puterea de rezoluție a unui astfel de obiectiv atinge 3 000 linii pe milimetru;

— mărirea indicelui de refracție al mediului de imersie ($n = 1{,}66$), la apertura 1,60 ,puterea de rezoluție atinge 6 000 linii pe milimetru pentru $\lambda = 0{,}55$ μ;

— folosirea unei lumini cu o lungime de undă mică. Utilizarea obiectivului monocromatic Zeiss cu apertura 1,25 în lumina ultravioletă ($\lambda = 0{,}275$ μ) permite atingerea unei puteri de rezoluție de 9 000 trăsături pe milimetru.

Scanned with OKEN Scanner

Profunzimea imaginii. De puterea de mărire a microscopului și de apertura obiectivului (cifra gravată pe obiectiv — 40,60), depinde profunzimea clarității imaginii (T). Fiecare obiectiv ne permite să vedem preparatul la o anumită profunzime într-un punct.

Profunzimea clarității imaginii este determinată după formula:

$$T = \frac{1\,000}{7\,AV} + \frac{\lambda}{2\,A^2}$$

În cazul puterii de mărire $V = 1\,350$, aperturii $A = 1{,}3$, lungimii de undă $\lambda = 0{,}55\ \mu$, rezultă o profunzime a clarității $T = 0{,}24\ \mu$.

Tabelul 2

Calculul profunzimii imaginii

Profunzimea, mm	Grosismentul	Apertura
1/10 mm	20 X	0,10
1/100 mm	75 X	0,25
1/1 000 mm	250 X	0,65
1/10 000 mm	1 200 X	1,25

Calculele arată că mărirea utilă a unui microscop fotonic nu poate depăși 1 300—1 450 X, ea fiind egală cu 1 000 A. O mărire mai accentuată nu evidențiază detalii noi pe imagine, iar iluminarea ei devine mai slabă.

Distanța frontală reprezintă distanța dintre fațeta lentilei frontale a obiectivului și fața superioară a lamelei ce acoperă preparatul supus observării. Unei distanțe focale scurte îi corespunde o distanță frontală mică, apertura fiind mai mare. Distanțele frontale sînt calculate în general pentru lamele de 0,17 mm grosime. În mod obligatoriu se vor folosi lamele foarte subțiri la obiective cu imersie puternică, care au ele însele distanțe frontale de 0,05—0,008 mm.

Imaginea dată de obiectivul de imersie este foarte sensibilă la variații de grosime ale lentilei.

Scanned with OKEN Scanner

Fiecare obiectiv puternic este prevăzut pentru corecție, în cazul variației grosimii lamelelor, cu un ansamblu de lentile care se deplasează prin manevrarea unui inel corector gradat, montat pe tubul obiectivului. Diviziunile inelului corespund grosimii lamelei.

1.3. Întreținerea microscopului

Microscopul trebuie ținut departe de căldură sau de umezeală. El nu trebuie trîntit, lovit sau udat cu diverse lichide. Nu trebuie, pe cît este posibil, să fie mutat prea des de pe o masă pe alta. Cînd este transportat la o distanță prea mare, trebuie pus în cutia lui și fixat cu șurubul de siguranță, pentru ca în timpul transportului să nu se miște în cutie.

Microscopul trebuie ferit de praf, de aceea, cît timp este scos din cutie și nu este folosit, se ține sub un clopot de sticlă sau din alt material (de exemplu pungi de material plastic). Nu se va lăsa tubul fără oculare, pentru că în această situație praful pătrunde prin tub în obiectiv. După întrebuințare, microscopul va fi pus în cutia lui și închis. Înainte de a fi pus în cutie, revolverul va fi întors în așa fel încît în dreptul platinei să se afle obiectivul cu cea mai mică putere măritoare, iar tubul va fi lăsat în jos, manevrînd viza macrometrică, atît cît permite aceasta.

Microscopul se șterge de praf cu o cîrpă moale de flanelă, fără scame, de preferință cu o piele de căprioară.

În caz de defectare, microscopul trebuie reparat numai de specialiști.

1.4. Funcționarea microscopului

Se ridică cu ajutorul vizei macrometrice tubul microscopului, apoi se fixează preparatul microscopic pe platină, cu ajutorul celor doi călăreți sau cu sistemul de fixare situat pe dispozitivul numuit „cărucior".

Scanned with OKEN Scanner

Apoi cu atenție rotim viza macrometrică și coborîm tubul microscopului pînă cînd observăm imaginea clară a preparatului microscopic.

Prima observare se face cu obiectivul cel mai mic, apoi se rotește cu atenție revolverul, aducînd pe axul microscopului obiectivul cel mai mare și îl apropiem cît mai mult de preparatul microscopic prin rotirea lentă, uniformă a vizei micrometrice, pînă cînd ne apare imaginea clară, mult mărită a obiectului de cercetat.

În cazul utilizării obiectivului cu imersie (90 X, 120 X), se adaugă pe lamelă 1—2 picături de ulei de cedru sau ulei de parafină, sau se pune direct pe preparat, în zona care trebuie observată (de exemplu la frotiuri), și apoi se apropie cu atenție obiectivul folosind viza micrometrică.

Imediat după examinare, obiectivul cu imersie se ridică cu ajutorul vizei macrometrice și se șterge cu pulpa degetului. Dacă obiectivul nu a fost șters la timp și uleiul s-a uscat, se curăță cu pulpa degetului sau cu o piele de căprioară umezită în cloroform.

Nu se va utiliza xilol sau benzen, pentru că se riscă dezlipirea lentilelor imersiunii, care sînt fixate cu substanțe solubile în aceste lichide.

Dacă uleiul de cedru s-a îngroșat sau s-a uscat, se fluidifică adăugînd puțin xilol. Xilolul se utilizează la curățirea uleiului de cedru de pe platina și stativul microscopului precum și la curățirea preparatelor microscopice după examinare cu imersie.

1.5. Utilizarea microscopului optic sau fotonic

Acest aparat optic este utilizat în scop didactic și științific, în studiile complexe de citologie, histologie, microbiologie, genetică, fiziologie, patologie, taxonomie și se află în dotarea laboratoarelor din cadrul Institutelor de cercetări biologice, medicale și agricole, în cadrul laboratoarelor de specialitate ale facultăților de biologie, medicină, farmacie, agronomie, geologie, precum și în întregul învățămînt general și liceal din țara noastră.

Scanned with OKEN Scanner

1.6. Tipuri de microscoape optice sau fotonice

În laboratoatele noastre didactice și de cercetare, întîlnim numeroase tipuri de microscoape, unele de fabricație românească (I.O.R.), cum sînt: microscopul didactic-monocular; microscopul de laborator binocular tip ML-4, microscoapele de cercetare, MC-1, MC-2, MC-3 și MC-5 (fig. 13) sînt microscoape universale la care se poate face o analiză diversă a preparatului prin lumină directă (transmisă), reflectată și polarizată, cuprinzînd de asemenea echipamentul necesar pentru fluorescență, ultramicroscopie, contrast de fază, analiză cu ultraviolete, sisteme de fotografiere și proiecție. Sistemul de fotografiere și tehnica efectuării microfotografiilor vor fi explicate la capitolul „Aparatura de microfotografiere".

Dintre microscoapele de fabricație străină amintim: Microfotul D16B(ROW), Microscopul monocular Zeiss, microscopul MBR-1 și MBR-2 din U.R.S.S., care posedă o serie de accesorii ca: obiectiv-micrometru, ocular-micrometru, aparat pentru desen, micromanipulator, instalații pentru microfotografii, microproiecții și filmare cu

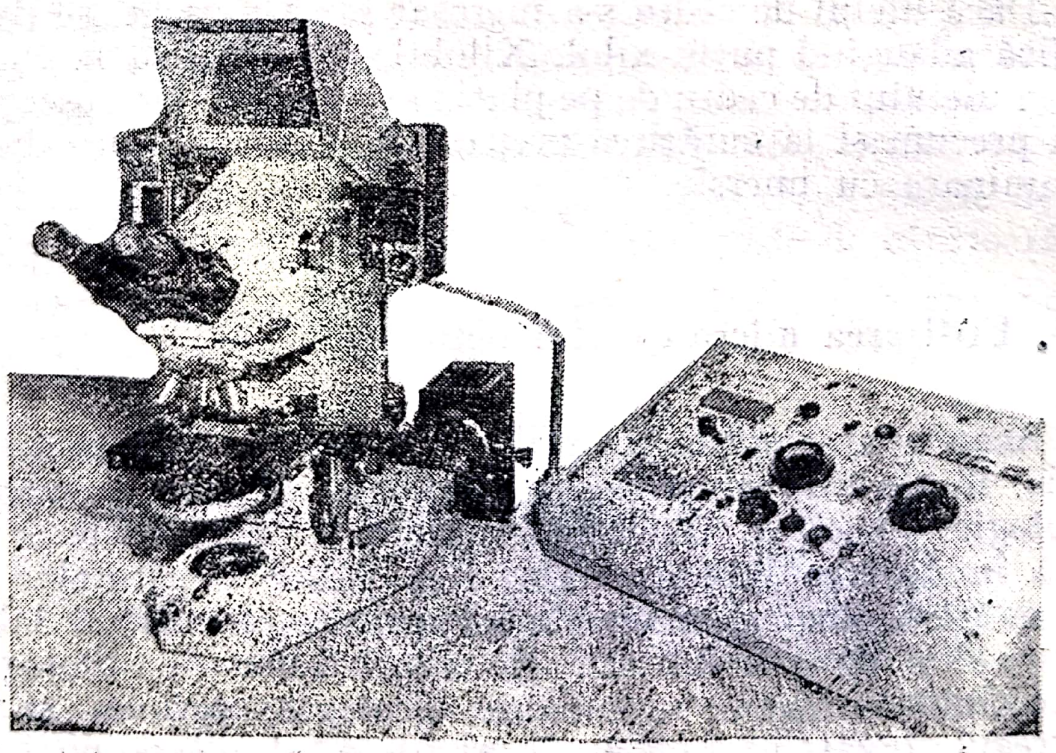


Fig. 13. Microscopul de cercetare M.C.-5, IOR.

Scanned with OKEN Scanner

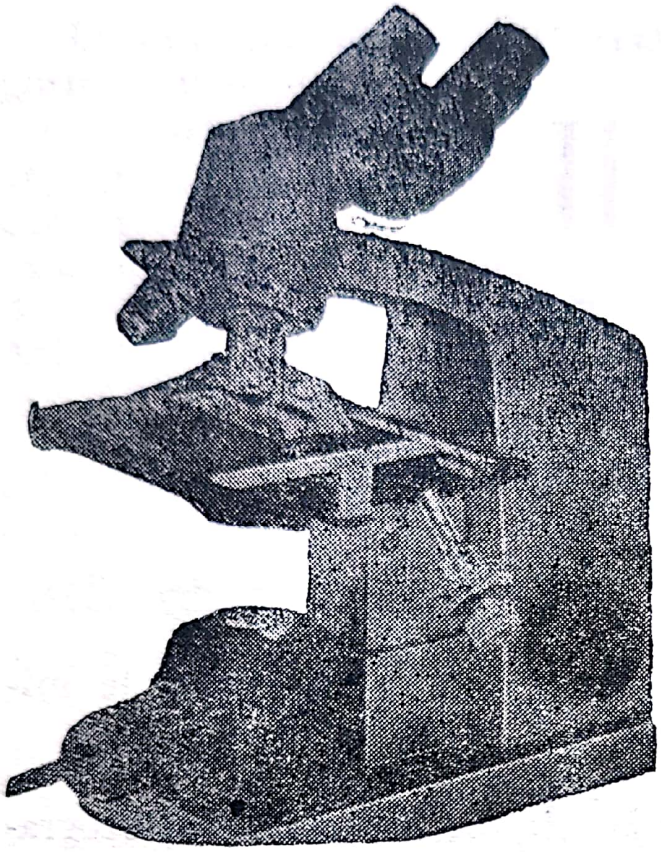


Fig. 14. Microscopul de laborator NEOPAN, Reichert (Austria).

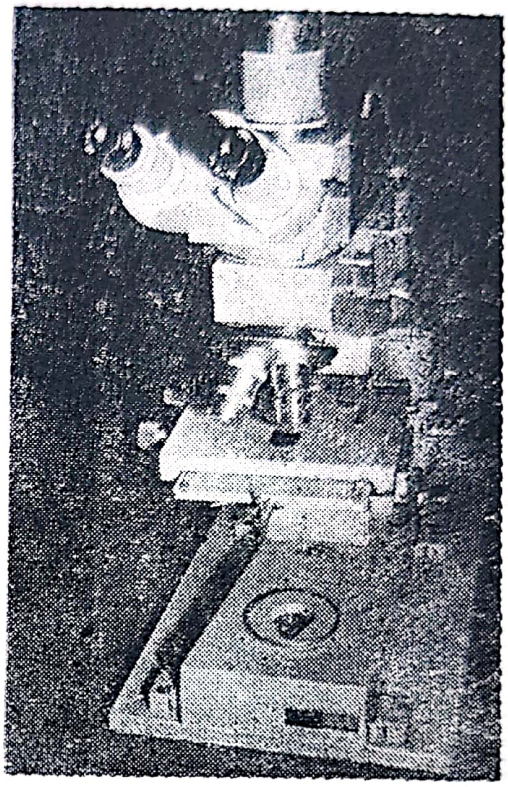


Fig. 15. Microscopul de cercetare Fluoval, C. Zeiss Jena, cu sistem de fotografiere.

9 filtre, microscopul de laborator Neopan (fig. 14) Ortopan-Reichert-Austria, Micro și Macro Promar-Leitz-Austria, Fluoval-C. Zeiss-Jena (fig. 15).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul

II

Aparatura fotografică și materialele necesare

Pentru efectuarea microfotografiilor, în afară de microscopul optic sau fotonic mai este nevoie de:

— un laborator fotografic adecvat;

— aparatura specială și dispozitive de microfotografiere;

— materiale și ustensile necesare laboratorului fotografic.

2.1. Laboratorul fotografic

Reprezintă o cameră de lucru care trebuie să îndeplinească o serie de condiții. Ea va fi astfel aleasă, încît să fie lipsită de vibrații.

De asemenea, încăperea trebuie să fie ferită de praf și în ea trebuie să se poată crea un întuneric deplin. În încăpere nu trebuie să pătrundă vapori de apă, gaze etc. a căror prezență poate deteriora aparatura și materialele fotografice.

Lîngă laboratorul fotografic trebuie să existe o altă încăpere mai mică (2,5 × 2 m este suficient), în care de asemenea să se poată asigura un întuneric deplin. În această cameră, prevăzută cu apă curgătoare și instalație electrică, se vor prelucra filmele fotografice, obținute în laboratorul de microscopie.

Scanned with OKEN Scanner

Laboratorul fotografic trebuie să cuprindă două categorii de utilaje.

— *Utilaje necesare prelucrării materialului negativ* (fig. 16) reprezentate de: lămpi de laborator, agățate pe perete, care trebuie să prezinte filtre roșu-rubiniu pentru filmele izocrome și filtre verde-închis pentru filmele pancromatice de 18 DIN, eventual 22 DIN; filtrele galben-verzui, tip Agfa 113 D, pentru hîrtia fotografică; tancurile de deve-

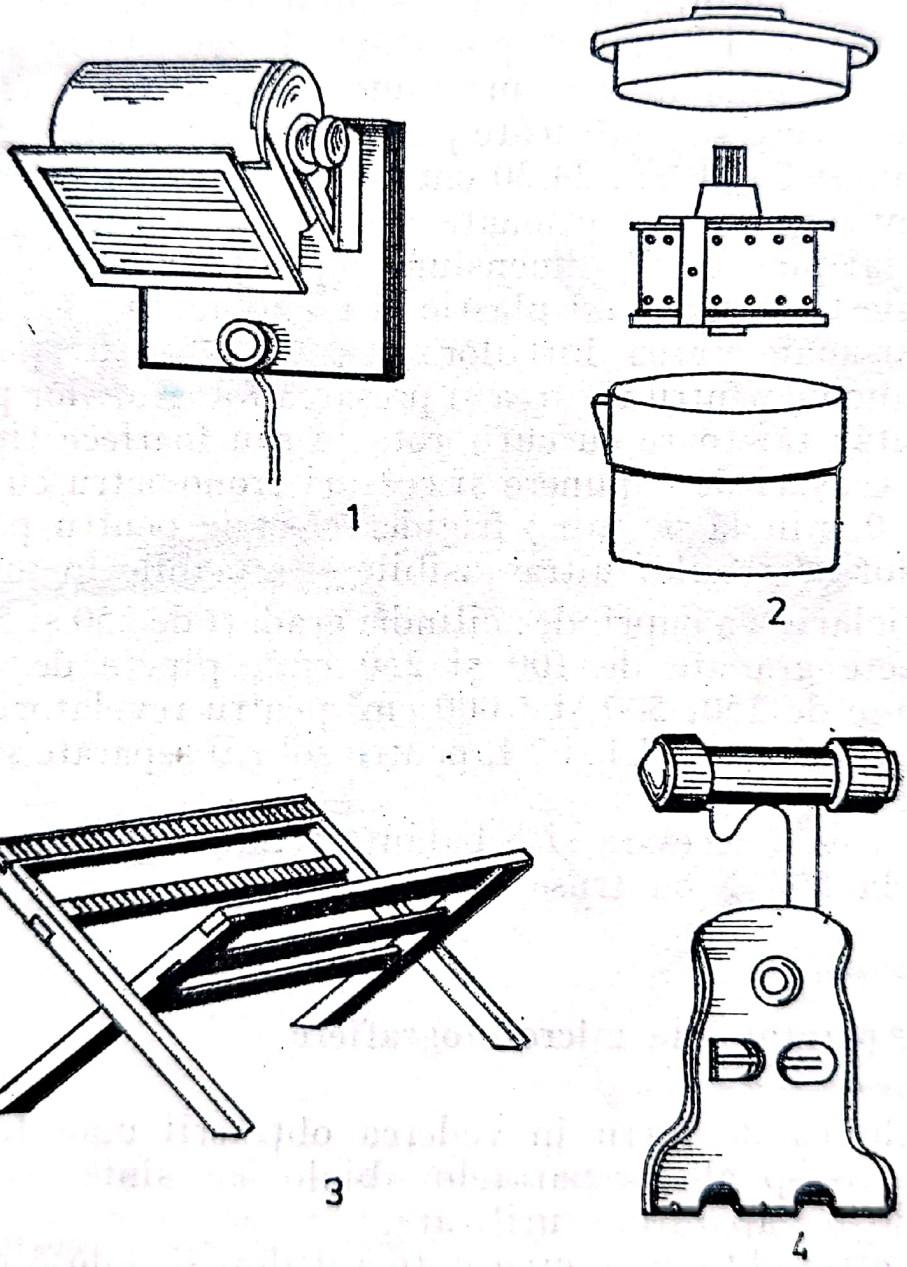


Fig. 16. Ustensile de laborator foto:
1 — lampă de laborator; *2* — tanc de developat Triplex; *3* — rastel pentru uscat plăci fotografice; *4* — clemă.

Scanned with OKEN Scanner

lopare, cu spirală și cu bandă Corex; cleme pentru agățarea filmelor sau clișeelor; dulapuri de uscare cu aer cald, sau un uscător Föhn; rastele de lemn în formă de X pentru uscarea plăcilor fotografice.

— *Utilaje necesare prelucrării materialului pozitiv* (fig. 17) reprezentate de: aparatul de copiat și rama de copiat, folosite pentru copierea negativelor; aparatul de mărit, care poate fi: cu lumină dirijată, cu lumină difuză, cu lumină combinată (după sursa de lumină) și cu punere la punct a imaginii: manuală, semiautomată, automată și universale — la care se pot mări clișeele de la formatul 24/36 mm pînă la 6/9 cm; rame încadratoare, de format variabil, care sînt fabricate pentru trei dimensiuni maxime și anume: 18/24 cm, 24/30 cm sau 30/40 cm; cuve sau tăvi de developare, confecționate din tablă smălțuită, fie din material plastic, de dimensiuni cuprinse între 6/9 și 50/60 cm; clești de material plastic și metal inoxidabil necesari pentru manevrarea hîrtiilor: uscător electric și rulouri din cauciuc pentru uscarea și presarea fotografiilor pe placa cromată: tăietoare cu cuțit rotativ sau foarfece tip ghilotină; ceasuri de expunere și ceasuri cronometru cu sonerie de la 0 min la 60 min; frigider electric pentru păstrarea filmelor și plăcilor ultrasensibile și sensibile în infraroșu.

Sticlăria va cuprinde: cilindri gradați de 250 și 500 cm^3, eprubete gradate de 100 și 250 cm^3, pipete de 10 cm^3, flacoane de 250, 500 și 1 000 cm^3 pentru revelatori cu formula uzuală și de 1 l și 2 l, pentru soluții separate și pentru fixator.

Mai este necesară și o balanță tehnică, pentru greutăți pînă la 500 g cu trusa respectivă.

2.2. Aparatura de microfotografiere

Tehnica de lucru în vederea obținerii unor fotografii la microscop ale preparatelor biologice sînt variate, în funcție de aparatele utilizate.

Pentru obținerea microfotografiilor se folosesc microscoape moderne de cercetare, care sînt prevăzute din construcție cu sisteme și anexe pentru fotografierea prepara-

Scanned with OKEN Scanner

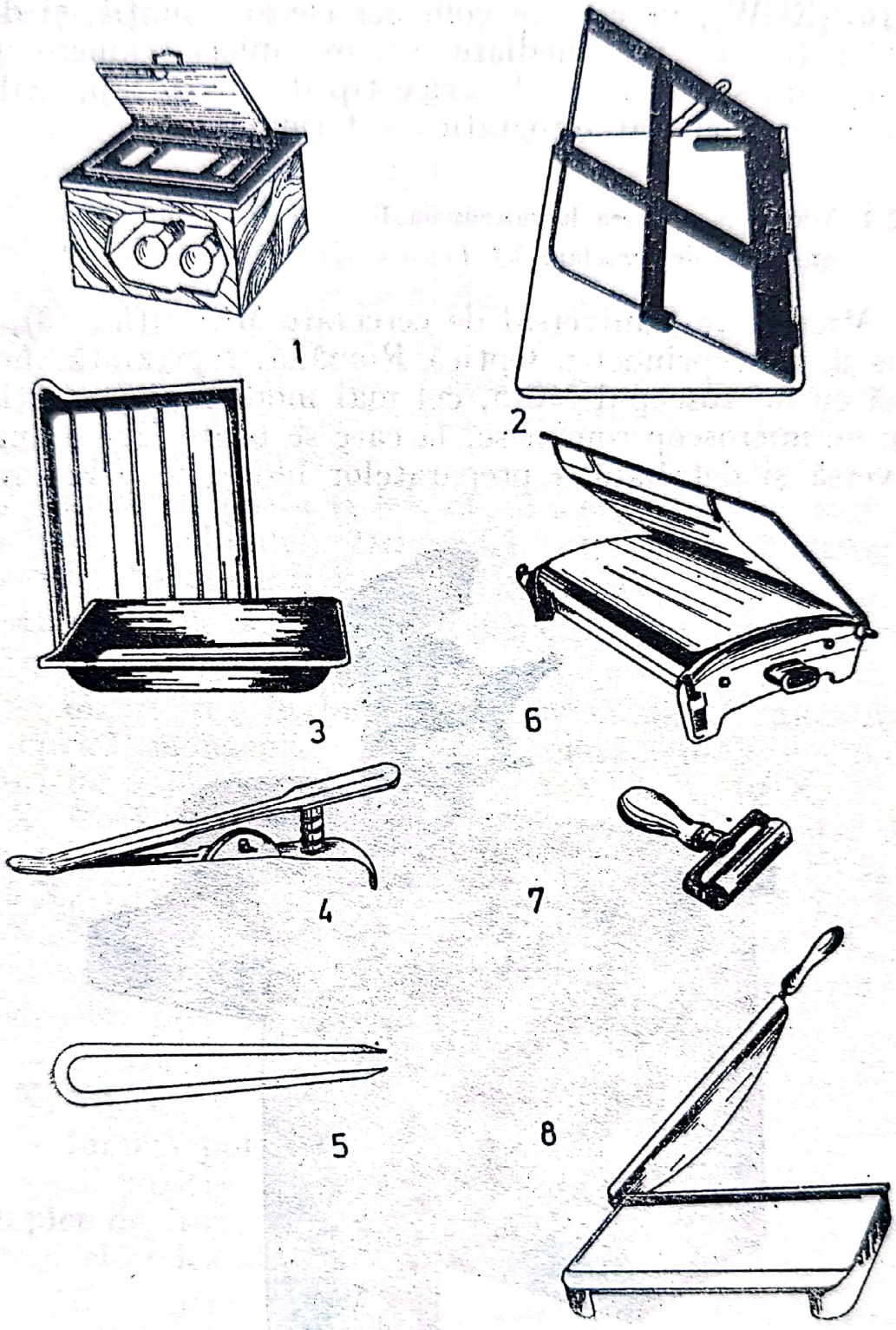


Fig. 17. Utilaje din dotarea laboratorului foto:
1 — aparat de copiat filme; *2* — ramă încadratoare de format variabil; *3* — tăvi de developare; *4* — cleşte din material inoxidabil; *5* — cleşte din material plastic; *6* — uscător electric; *7* — rulou de cauciuc; *8* — foarfecă cu cuţit rotativ.

Scanned with OKEN Scanner

telor biologice, așa cum sînt: MC-1, MC-5 și Microfotul D16B(ROW), pe care le vom descrie amănunțit, și dispozitive (tuburi intermediare microsciopice), camere verticale, care se pot atașa la orice tip de microscop, utilizîndu-se orice aparat fotografic de format mic.

2.2.1. Microfotografierea la microscopul universal de cercetare MC-1

Microscopul universal de cercetare MC-1 (fig. 18), produs de Intreprinderea Optică Română, reprezintă, împreună cu microscopul MC-5, cel mai modern și perfecționat tip de microscop românesc, la care se poate face o analiză diversă și detaliată a preparatelor biologice prin lumină

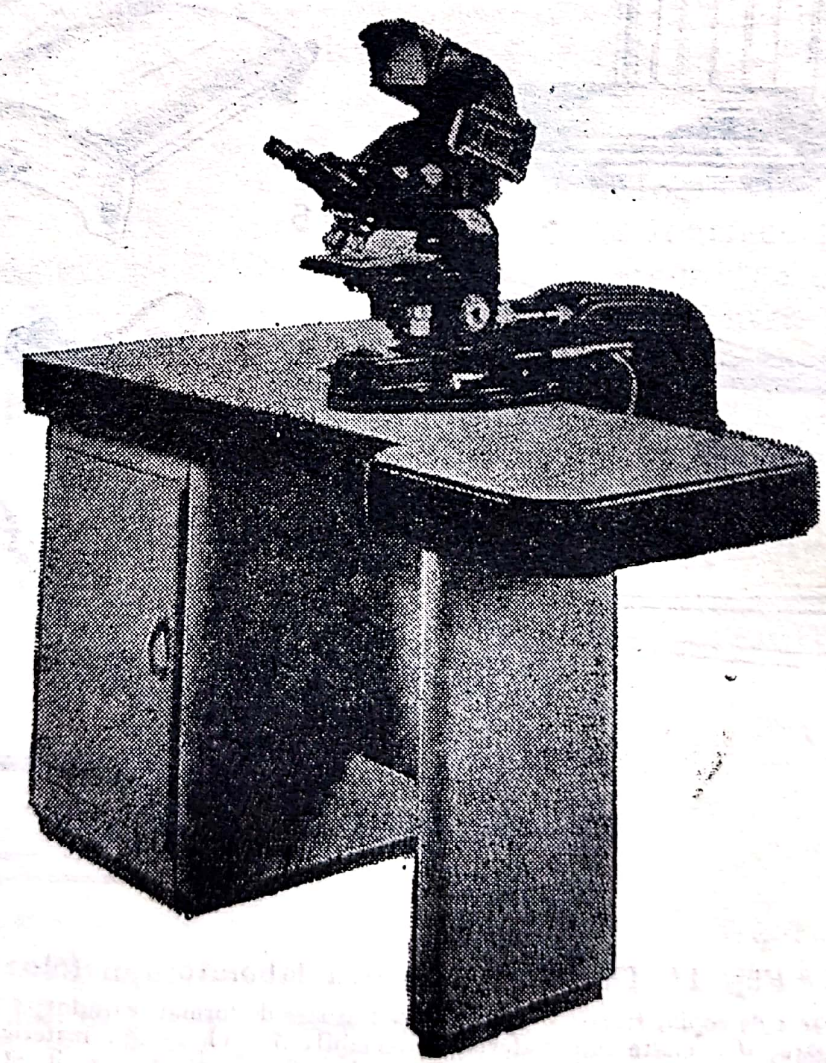


Fig. 18. Microscopul de cercetare, MC-1—IOR, fără instalația electrică și tabloul de comandă.

Scanned with OKEN Scanner

directă (transmis), reflectată și polarizată, contrast de fază, fluorescență, cîmp întunecat, prezentînd și un sistem complex pentru fotografiere și proiecție. Prin urmare, în cadrul acestui microscop se găsesc incluse toate tipurile de microscoape (fotonic, în cîmp întunecat, cu contraste de fază, în lumină polarizată, în lumină fluorescentă, în infraroșu), exceptînd cel electronic.

Sistemul complex de fotografiere permite fotografierea alb-negru și color a preparatelor biologice.

Microscopul universal MC-1, este construit pentru un domeniu larg de cercetare, folosind metode variate de observare, avînd în același timp posibilități de fotografiere și proiectare a imaginii.

Microscopul poate fi folosit cu succes în cercetări din domeniul biochimiei, fiziologiei, citologiei, histologiei, geneticii, metalografiei, mineralogiei etc.

Metodele de cercetare și posibilitățile microscopului universal MC-1 sînt:

— observarea în lumină transmisă direct sau oblică, cu optică monoculară sau binoculară, folosind diverse tipuri de obiective: acromate de 3 X, 6 X, 10 X, 20 X, 40 X, 90 X, apocromate de 40 X (cu corecție pentru grosimea lamelei), 60 X, și 90 X; oculare de tipul Huygens de 5 X, 7, X, 10 X, 15 X, compensatoare de 5 X, 7 X, 10 X, 15 X și un condensor cu apertură maximă 1,4;

— observarea în cîmp întunecat, folosind 4 tipuri de condensori pentru cîmp întunecat;

— contrast de fază avînd obiectivele de 10 X, 20 X, 40 X, 90 X.

— lumină polarizată cu polaroizi;

— dispozitiv pentru fluoroscopie, prezentînd un set complet de filtre și lampă cu vapori de mercur, avînd o putere electrică de 200 w;

— dispozitive pentru iluminare prin reflexie și combinat reflexie-transmisie, prezentînd obiective speciale de 7 X, 14 X, 22 X, 45 X.

Microscopul mai este prevăzut cu patru locașuri pentru patru surse de iluminare diferite, dintre care una pentru iluminare prin reflexie. În aceste locașuri se introduc două

Scanned with OKEN Scanner

lămpi cu incandescență de 6 V, 30 w, o lampă cu vapori de mercur de 200 w, o lampă cu arc electric de 500 w.

Ele pot fi introduse în sistemul optic al microscopului prin simpla comutare a unui comutator optic.

Microscopul MC-1 mai este prevăzut cu un dispozitiv cu comutator optic, care permite dirijarea razelor care formează imaginea în cinci direcții diferite, pentru fotografiere sau proiecție după cum urmează:

— fotografierea monocromă pe film de 35 mm;
— fotografierea color pe film de 35 mm;
— filmarea obiectului cercetat pe film de 16 mm sau 35 mm;
— fotografierea pe plăci 6 × 9;
— proiecția pe ecran dreptunghiular cu diagonala de 15 cm;
— proiecție pe masă pentru desenare;
— proiecție pe ecran avînd diametrul de 1 m;
— măsurarea fluxului luminos se face cu fotocelula, în vederea stabilirii timpului de expunere.

Pentru fotografiere, vizarea se face prin dispozitivul binocular al microscopului sau privind în dispozitivele de vizare ale aparatelor foto pe care le utilizăm.

Pentru realizarea microfotografiilor trebuie efectuate o serie de manevre a căror succesiune este următoarea:

— Într-o cameră obscură se încarcă cele două aparete Exacta Varex cu film de 35 mm, sau casete cu plăci fotografice de 6 × 9 cm. Casetele se numerotează și se notează cu sensibilitatea plăcilor cu care au fost încărcate. Ambele aparate pot fi încărcate cu același tip de film sau diferite din punct de vedere al culorii sau sensibilității.

Alegerea filmului este determinată de scopul cercetării. Pentru microfotografii de preparate cu contraste mari se vor folosi filme și plăci cu sensibilitate mai mare (15, 17, 21 DIN), iar pentru preparatele lipsite de contrast sînt recomandate materiale cu sensibilitate mică (7, 10 DIN). La alegerea materialelor fotosensibile se va ține cont de următorii factori: sensibilitatea la lumină generală, sensibilizarea cromatică (spectrală) și compoziția spectrală a surselor de lumină folosite la microfotografiere.

Scanned with OKEN Scanner

— Aparatele încărcate se montează pe microscop în poziția de fotografiere, cu vizoarele deschise, îndreptate spre operator, nu înainte însă de introducerea în locașul lor a ocularelor speciale, foto I sau foto II, după caz și scop.

— La fiecare aparat se montează cablul declanșator flexibil.

— Se vizează prin binocular. Ocularul cu reticul de încadrare (RX-RI) se așază la diviziunea zero. Se privește reticulul de încadrare și în caz de neclaritate a acestuia se reface reglajul prin rotirea lentilei ocularului RI.

— Pe platina microscopului se așază preparatul; prin deplasarea acestuia pe verticală și orizontală se face punerea la punct și încadrarea în cîmpul microscopului a sectorului pe care-l dorim să-l fotografiem. Punerea la punct se face pentru ocularul cu reticul, iar celălalt ocular se reglează pînă cînd apare clară și imaginea în acesta. În acest moment toate locurile de fotografiere sînt în corespondență.

— Se trage de butonul de deasupra revolverului în afară pînă la capătul cursei.

— Se acționează asupra butonului din fața schimbătorului de proiecție a luminii pentru măsurarea intensității fluxului luminos, în funcție de intensitatea indicată de exponometrul de fotografiere. Reglarea timpului de expunere se face în funcție de indicațiile exponometrului și de sensibilitatea filmului sau a plăcii fotografice.

— După reglarea timpului de expunere se acționează din nou asupra butonului din fața schimbătorului de proiecție a luminii pentru scoaterea din sistemul optic a exponometrului. Dacă toate manevrele au fost corect executate, imaginea preparatului trebuie să apară pe geamul mat al aparatului fotografic.

— Se deschide capacul lateral al aparatului fotografic și se privește prin geamul mat. Dacă imaginea este bine centrată se poate trece la fotografierea propriu-zisă. Se armează aparatul prin declanșarea automată a timpilor lungi de expunere, manevrarea pîrghiei de armare spre stînga pînă la refuz, după care se armează dispozitivul.

Scanned with OKEN Scanner

În această situație, aparatul este pregătit pentru a înregistra imaginea preparatului de pe lamă.

— Declanșarea se face numai cu declanșatorul flexibil, după o prealabilă verificare a clarității imaginii, care se poate face fie prin intermediul lupelor din vizoarele aparatelor foto, fie privind prin ocularele microscopului.

După terminarea tuturor imaginilor, filmul se trage din nou în casetă, se scoate din aparat și este supus prelucrării (I. Anghel N. Toma).

2.2.2. Microfotografierea cu Microfotul D.16.B (ROW)

Microscopul de cercetare D16(ROW), fabricat în R.D.G. este prevăzut cu un sistem de microfotografiere (fig. 19).

Înainte de a trece la executarea microfotografiilor trebuie executate următoarele operații:

— În susținătorul special, fixat lateral pe stativul înclinat al microscopului, se introduce ocularul; scoaterea

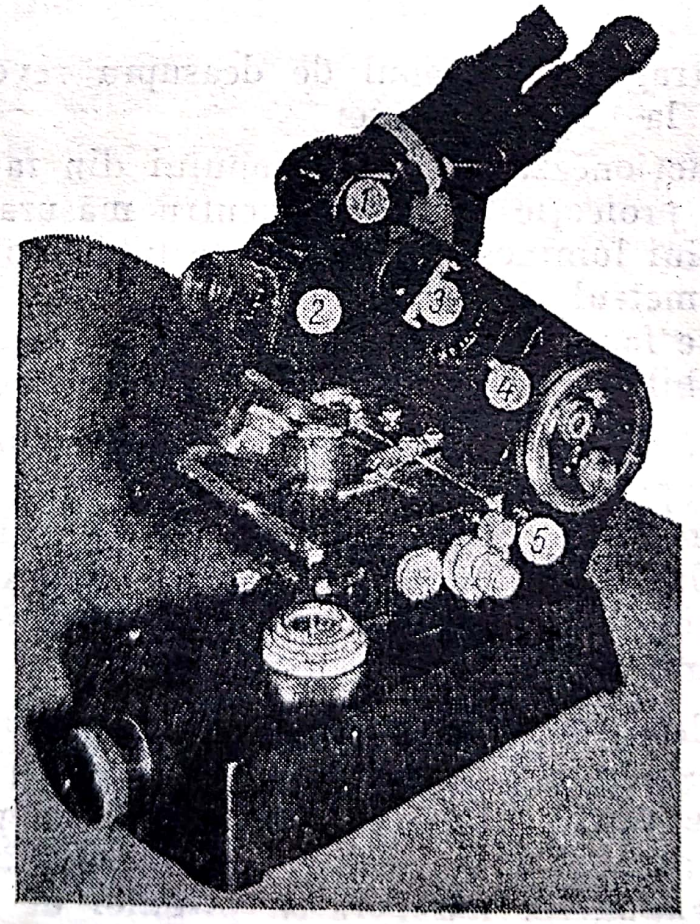


Fig. 19. Microfotul D.16.B (ROW)

Scanned with OKEN Scanner

ca și introducerea acestuia în lăcașul său se face prin apăsarea simultană asupra celor două manete.

— Se montează filmul în casetă. Caseta se scoate din lăcașul său împreună cu casca de protecție prin rotirea roții de fixare spre stînga. Pe lagărul superior se fixează caseta plină, iar pe cel inferior, aflat în legătură cu butonul de tracțiune, caseta goală. Filmul se trage pe sub fereastra casetei dintr-o parte în cealaltă, apăsînd cu degetul mare pe lama din spatele ferestrei. Trebuie acordată multă atenție montării filmului în casetă, în sensul că în orificiile laterale ale acestuia să intre perfect roțile dințate de tracțiune ale casetei, deoarece orice imperfecțiune duce la ruperea filmului. Caseta astfel pregătită se acoperă cu carcasa de protecție și se introduce în lăcașul de stativ. Se rotește spre dreapta discul de fixare pînă cînd caseta este perfect imobilizată prin rotirea butonului de tracțiune, fixat lateral pe casetă, filmul se trage în caseta goală, primele două poziții fiind voalate.

În lăcașul special, situat lateral pe stativul microscopului, între caseta ocular și dispozitivul de expunere se fixează firul declanșator.

Microscopul astfel pregătit, se poate trece la executarea microfotografiilor, efectuînd numeroase operații în ordinea următoare:

— se fixează în cîmpul microscopului sectorul de preparat care corespunde în cel mai înalt grad scopului urmărit. Sectorul ales trebuie să fie clar, structurile sale fiind în același plan vizual, uniform și intens luminat;

— ocularele se rotesc cu 180°C;

— se privește prin ocularul situat sub dispozitivul de fixare a ocularelor iar prin manevre adecvate se încadrează structura ce urmează a fi fotografiată în dreptunghiul trasat pe lentila frontală a ocularului. Se rotește ocularul într-un sens și altul pînă cînd crucea din centrul ocularului se vede clar, formată din linii simple, nedublate. Dacă este necesar, se mai face o corecție a clarității preparatului prin mișcarea vizei micrometrice.

— sistemul foto se armează prin ridicarea manetei situate lateral pe porțiunea înclinată a stativului în spatele dispozitivului de expunere;

Scanned with OKEN Scanner

— timpul de expunere se stabilește prin fixarea manetei indicator la nivelul uneia dintre cifrele indicate pe disc. Dacă expunerea trebuie să fie mai mare de o secundă, maneta indicator se fixează în dreptul literei „B". În acest caz, pentru expunere este necesar a avea la dispoziție un cronometru sau un ceas cu secundar;

— se apasă pe butonul firului declanșator, realizîndu-se expunerea filmului. Dacă timpul de expunere depășește o secundă, se ține în această poziție pînă la scurgerea integrală a timpului stabilit anterior;

— după expunere, filmul se rulează în casetă. Pentru aceasta se procedează astfel: se apasă în direcție perpendiculară pe butonul de rularea filmului și se rotește puțin spre dreapta, fără a se mai apăsa pe buton; se continuă rotirea pînă cînd se aude o ușoară pocnitură, ceea ce indică intrarea în funcție a piedicii (I. Anghel, N. Toma).

2.2.3. Microfotografierea cu ajutorul tubului foto

Pentru obținerea microfotografiilor, cele mai comode dispozitive care se găsesc în accesoriile microscoapelor de cercetare MC-1, MC-2, MC-3 sînt tuburile intermediare foto și dispozitivul Miflex (fabricație Zeiss) (fig. 20, 21), care se pot adapta la oricare tip de microscop și la care putem să atașăm oricare aparat fotografic de format mic (Exacta Warex, Leica, Kontax, Kiev etc.).

Dispozitivele Miflex pot fi simple sau cu vizare laterală, prezentînd lateral un ocular telescopic, iar în partea superioară o cameră obscură (fig. 22 *a*, *b*).

Pentru obținerea microfotografiilor la oricare microscop, atașîndu-se fie tubul intermediar foto fie dispozitivul Miflex, se efectuează o serie de operații în următoarea succesiune:

— Șurubul care fixează tubul microscopului de stativ se slăbește prin deșurubare și astfel este posibilă îndepărtarea tubului împreună cu ocularele. Tubul odată scos, imediat se ambalează și se depozitează într-un loc ferit de praf (recomandabil este aranjarea lui în lăcașul special al lăzii în care a fost ambalat microscopul).

Scanned with OKEN Scanner

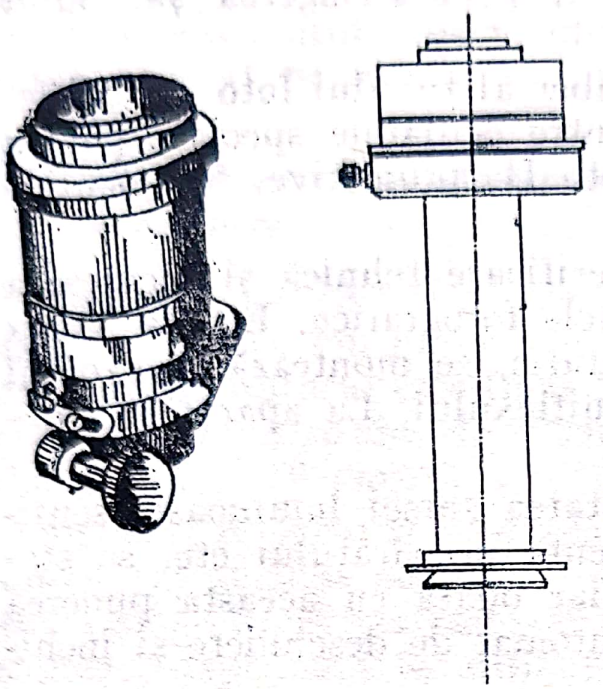


Fig. 20. Tipuri de tuburi foto:
a — tubul intermediar foto; *b* — dispozitivul Miflex.

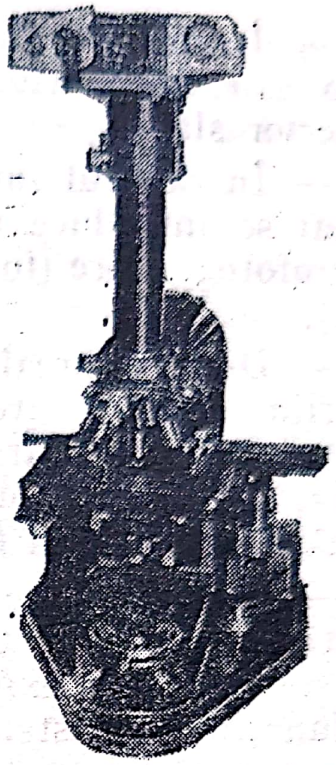


Fig. 21. Microscopul MC 2 la care s-a montat dispozitivul Miflex cu aparatul de fotografiat Exacta Varex.

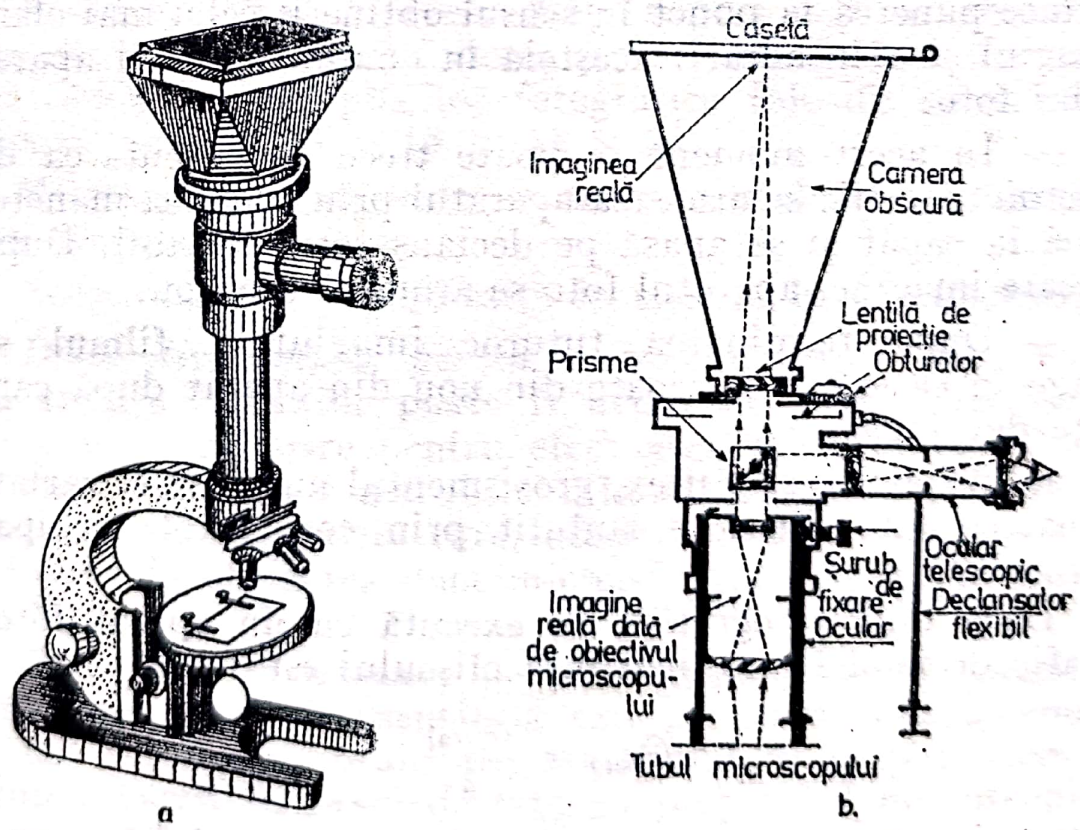


Fig. 22. Microscopul de laborator la care s-a atașat dispozitivul Miflex cu vizare laterală (*a*) și schema optică a dispozitivului (*b*).

Scanned with OKEN Scanner

— În locul tubului microscopic se montează tubul foto sau dispozitivul Miflex, prin strîngerea șurubului anterior slăbit.

— În capătul superior liber al tubului foto sau Miflexului se introduce unul dintre ocularele speciale pentru microfotografiere (foto I, foto II, proiective, foto-oculare etc.).

— După o prealabilă verificare tehnică și încărcarea cu film, unul dintre aparatele fotografice, Exacta Varex sau alt tip de aparat fotografic, se montează la capătul distal al tubului foto sau miflexului. La aparat se montează declanșatorul flexibil.

— În funcție de intensitatea sursei luminoase, sensibilitatea filmului, transparența preparatului etc. se stabilește tipul de expunere, iar odată cu aceasta punerea în funcțiune a sistemului automat de deschidere și închidere a perdelei.

Prin deschiderea capacului lateral, imaginea preparatului de pe platina microscopului trebuie să ne apară pe geamul mat. Dacă situația o cere, prin manevre adecvate se face punerea la punct în sensul obținerii celei mai clare imagini și a încadrării acesteia în cîmpul optic al aparatului foto.

— În acest moment se poate trece la executarea de microfotografii: se armează aparatul prin tragerea manetei pînă la capăt și se apasă pe declanșatorul flexibil. După fiecare imagine, aparatul foto se armează din nou.

— După terminarea tuturor imaginilor, filmul se trage în casetă și se scoate din nou din aparat după care este developat.

La dispozitivul Miflex, grosismentul nu poate fi variat, deoarece este dinainte stabilit prin constantele echipamentului.

Dacă microfotografiile se execută cu un aparat fotografic de model mic, mărimea clișeului este:

$$G_{foto} = \frac{G_{total}}{2}$$

adică jumătate din grosismentul microscopului.

Dacă în locul ocularului microscopului se folosesc proiective, atunci grosismentul imaginii este dat de produsul dintre grosismentul obiectivului și grosismentul proiectivului, indicat pe montură.

2.2.4. Alte dispozitive pentru fotografierea la microscop

Camerele verticale (fig. 23). Acestea au o extindere variabilă, fiind cu burduf. Punerea la punct se face pe geam mat, iar obturatorul este fixat la partea inferioară. Plăcile fotografice folosite sînt de mărime medie sau mare (9 × 12 pînă la 13 × 18 cm).

În cazul folosirii acestor aparate, la calculul grosismentului total obținut pe placa fotografică trebuie să se țină seama și de lungimea camerei (distanța T dintre placă și ocular) , exprimată în milimetri:

$$G_{foto} = G_{vizual} \cdot \frac{T}{250}$$

Bancurile optice, servesc drept suport pentru camerele orizontale (fig. 24), extinderea putînd atinge 2 m (formatele obișnuite ale plăcilor fotografice folosite cu aceste dispozitive sînt 13 × 18 și 18 × 24).

Microscopul însuși este așezat orizontal și stabilitatea este excelentă.

Aceste camere sînt folosite în special în metalografie.

Dispozitiv simplu pentru microfotografiere (fig. 25). Nu fiecare laborator poate fi utilat cu dispozitive moderne și costisitoare pentru efectuarea microfotografiilor. Oricine își poate construi însă în laborator, cu mijloace modeste, un dispozitiv care, adaptat la microscop, poate fi folosit la obținerea unor microfotografii de foarte bună calitate.

Principiul se bazează pe proiectarea imaginii mărite direct pe hîrtia fotosensibilă sau pe placă, microscopul jucînd rolul unui proiector, iar filmul ce se proiectează fiind înlocuit în cazul de față cu preparatul microscopic care se fotografiază.

Scanned with OKEN Scanner

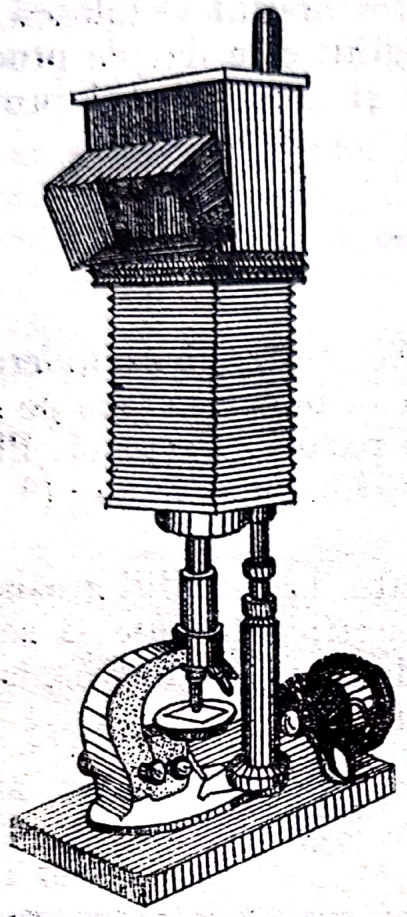


Fig. 23. Cameră verticală Zeiss montată la microscop.

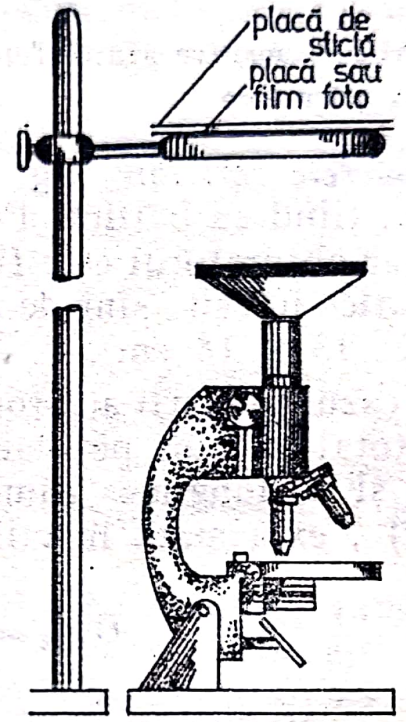


Fig. 25. Instalație simplă pentru microfotografiere.

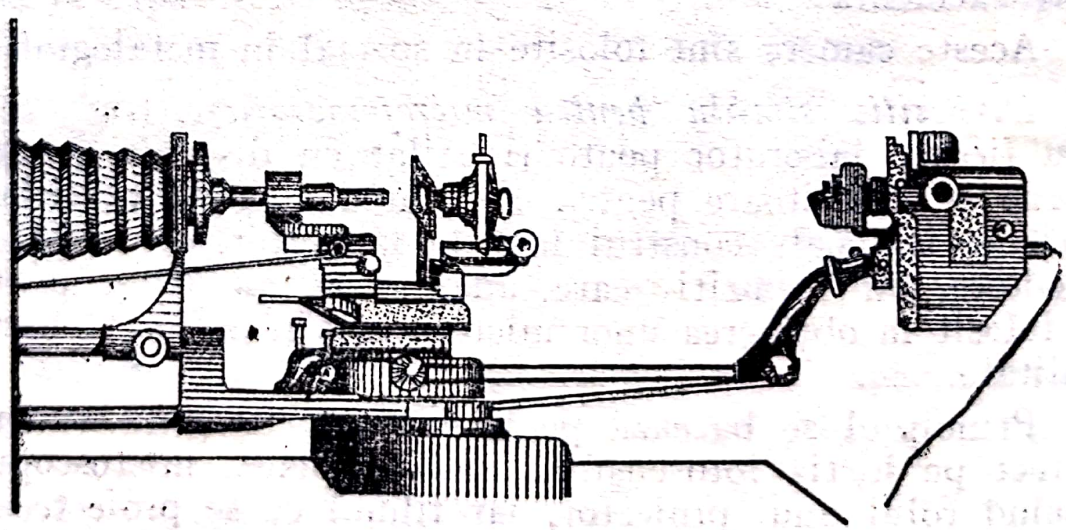


Fig. 24. Cameră orizontală pentru microfotografiere.

Scanned with OKEN Scanner

În locul ocularului microscopului se așază în tubul microscopului o pîlnie confecționată din hîrtie neagră mată. Gulerul pîlniei protejează materialul fotosensibil împotriva iluminării laterale.

Lîngă microscop se montează un stativ pe care se fixează un inel cu mufă, pe acesta se așază un geam dintr-o sticlă de bună calitate (de exemplu o placă fotografică, curățată de gelatină), pe care se pune un geam mat cu partea mată spre microscop. Toată instalația se montează într-o cameră oscură (I. Goldhaar).

Mărirea sau micșorarea se asigură deplasînd cercul în jos sau în sus.

Imaginea se observă pe geamul mat, reglîndu-se șurubul micrometric al microscopului, astfel încît să obținem o imagine cît mai clară.

Se întrerupe sistemul de iluminare și la lumina roșie se introduce sub geamul mat hîrtia sau placa fotografică. Se apasă cu o greutate, astfel încît hîrtia să adere perfect la suprafața geamului.

Expunerea se efectuează prin aprinderea lămpii care ilumineză oglinda microscopului, care produce impresionarea stratului de emulsie fotografică. Expunerea se face în așa fel încît să fie eliminată orice trepidație a sistemului.

2.3. Substanțe chimice utilizate în laboratorul fotografic

Developanții: hidrochinonă, metol, amidol.

Baze și săruri: carbonatul de sodiu anhidru, borax, amoniac, sodă caustică, potasă caustică.

Sulfiți: sulfit neutru de sodiu anhidru, sulfit acid sau bisulfit de sodiu, metabisulfit de potasiu cristalizat, hiposulfit de sodiu cristalizat.

Diverse: Bromură de potasiu cristalizată, alaun de crom, alaun ordinar, clorură mercurică, sulfat de sodiu cristalizat, permanganat de potasiu, persulfat de amoniu.

Toate substanțele se păstrează în vase sau flacoane originale. Substanțele anhidre livrate în ambalaj de hîrtie

Scanned with OKEN Scanner

trebuie trecute imediat în borcane de sticlă sau în cutii din metal inoxidabil, bine închise.

Este bine ca apa care se folosește la prepararea soluțiilor să fie distilată, iar temperatura ei să nu depășească 45°C. O apă prea „dură" (cu conținut mare de săruri de calciu) folosită în prepararea soluțiilor poate da lucrări necorespunzătoare. Revelatorii trebuie preparați respectînd ordinea de dizolvare arătată în rețetă. Nu se introduce nici o substanță nouă în soluție pînă ce nu s-a dizolvat complet substanța introdusă anterior, Este bine să se filtreze soluțiile finale obținute. Soluțiile se lasă liniștite cel puțin 24 ore. Nu se vor agita înainte de folosire.

Fixatorul nu trebuie preparat imediat înainte de folosire, pentru că dizolvarea hiposulfitului produce o scădere simțitoare a temperaturii, fapt pentru care prelungește timpul de fixare.

Toate sticlele se etichetează obligatoriu, iar etichetele vor fi parafinate. Etichetele se ung cu o soluție de parafină în eter.

Se vor evita dopurile de sticlă rodate, întrucît se înțepenesc în gîtul sticlei. Sticlele se pot astupa foarte bine cu dopuri de cauciuc parafinate. Revelatorii se păstrează numai în sticle brune, feriți de lumină și la o temperatură de maximum 20°C. Sticlele vor fi cît mai pline, pentru a avea o suprafață cît mai mică în contact cu aerul.

2.3.1. Conservarea materialelor fotografice

Filmele și plăcile se ambalează în cutii învelite în hîrtie neagră. Pe fiecare cutie se notează: tipul plăcii (peliculei), formatul, sensibilitatea generală și sensibilitatea cromatică precum și numărul emulsiei.

Cunoașterea proprietăților emulsiei este importantă pentru stabilirea duratelor de expunere, a contrastului, a puterii de rezoluție și a sensibilității cromatice.

Trebuie să se evite conservarea materialelor fotografice un timp mai îndelungat decît termenul de expirare. Totuși, materialul sensibil poate fi folosit încă mult timp după expirare, dacă a fost păstrat în bune condiții, adică ferit de căldură și umiditate, de substanțe și materiale dăunătoare (amoniac, sulfuri, pulberi etc.).

Scanned with OKEN Scanner

Filmele și plăcile sensibile la raze infraroșii se vor păstra în felul următor:

— cînd sînt sensibile la lungimi de undă sub 0,9 μ se pot păstra în frigider;

— cînd sensibilitatea corespunde la o lungime de undă mai mare decît 0,9 μ se păstrează în zăpadă carbonică;

— durata de păstrare a acestor filme este de maximum 4—5 luni, cînd condițiile de păstrare sînt cele arătate.

2.3.2. Manipularea materialelor fotografice

Filmele pancromatice se manipulează în întuneric deplin. Acest lucru nu prezintă dificultăți cînd obiectele necesare lucrului sînt așezate la îndemînă, după necesitate.

În cazul în care emulsia este atinsă cu degetele, pot rămîne amprente, care dăunează bunei calități a pozei. Mîinile trebuie să fie curățate și uscate. Cînd placa se introduce în casetă, trebuie să mai rămînă un spațiu între marginea plăcii și lăcașul casetei. Placa nu trebuie să fie introdusă forțat. Dimensiunile plăcilor sînt întotdeauna cu cîțiva milimetrii mai mici decît dimensiunile standard.

Fața sensibilă a plăcii se identifică atingînd cu limba un colț al plăcii. Suprafața lipicioasă este aceea cu emulsie.

Marcajul unui clișeu se face cu tuș negru pe partea cu gelatină.

Plăcile se vor așeza în cutiile lor, iar filmele și peliculele în cutii de carton.

Înmagazinarea filmelor și plăcilor expuse se va face într-o încăpere uscată, ferită de gaze și alte substanțe.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul

III

Prelucrarea materialelor fotografice

3.1. Soluții revelatoare

Există o serie întreagă de rețete universale cu care se pot trata orice materiale fotografice, obținînd o bună calitate a imaginii. De asemenea există o serie de rețete speciale, folosite de la caz la caz. Schimbînd proporția substanțelor din care se fac revelatorii, putem obține diferite tonalități de developare, după cum prezentăm în tabelul 3,

Tabelul 3

Compoziția chimică a revelatorilor micști

Substanța	Atenuat		Normal		Dur		Extradur	
Metol, g	8	5	3	2	1	1	—	—
Sulfit de sodiu anhidru, g	20	30	40	60	80	100	—	200
Hidrochinonă, g	—	2	4	6	8	10	12	15
Carbonat de sodiu anhidru, g	20	25	30	40	50	70	—	—
Sodă caustică, g	—	—	—	—	—	—	25	—
Bisulfit de sodiu lichid, cm^3	—	—	—	—	—	—	35	—
Formol, cm^3	—	—	—	—	—	—	—	20
Bromură de potasiu, g	0,5	0,1	1	1,5	2	3	5	—

Scanned with OKEN Scanner

combinînd diferitele rețete de bază date de o serie de autori de specialitate.

Revelatorii de acest gen, așa-numiții revelatori micști cu metol-hidrochinonă, pot avea compozițiile din tabelul 3.

La fixare, dintre aceste rețete se adaugă apă pînă la un litru. Durata de developare este 3—4 min pentru filme și de 5—6 min. pentru plăci, temperatura băii de 18°C.

Granulația și voalarea devin supărătoare la o durată de developare mai mare de 10 min. Temperatura băilor influențează considerabil aceste caracteristici. Astfel, metolul, un developant moale, lucrează aproape sigur de la 12 pînă la 15°C. Hidrochinona, un developant dur, lucrează și el aproape singur de la 23 pînă la 25°C.

Pentru prepararea oricăruia dintre revelatorii arătați în tabelul 3, se dizolvă mai întîi, în puțină apă (preferabil apă distilată), la temperatura de 55°C, un cristal de sulfit de sodiu. Apoi sînt introduși ceilalți componenți, în ordinea arătată în rețetă.

Nu se toarnă substanța următoare, pînă ce nu se dizolvă complet substanța introdusă înainte.

Revelatorul este incolor sau foarte slab colorat, dacă a fost conservat bine. Soluția se aruncă atunci cînd revelatorul capătă o culoare galbenă sau brună.

Revelatorul cel mai mult folosit poate fi preparat cu o concentrație de cinci ori mai mare, iar la nevoie se diluează într-un mod corespunzător (I. Goldhaar).

Un alt tip de revelator care poate asigura contrastul dorit este următorul:

Soluția A

Sulfit de sodiu	120 g
Hidrochinonă	16 g
Bromură de potasiu	4 g

Soluția B

Sulfit de sodiu	20 g
Metol	6 g
Bromură de potasiu	1 g

Se completează cu apă distilată pînă la 1 l.

Scanned with OKEN Scanner

Soluția C

Carbonat de sodiu . . . . . 160 g

Se completează cu apă distilată pînă la 1 l.

Soluțiile *A*, *B*, *C*, prin amestecare în diferite proporții, dau revelatori cu caracteristici variate (tabelul 4).

Tabelul 4

Compoziția revelatorilor care asigură contrastul

Tipul de revelator	*A*	*B*	*C*
Atenuat	6 cm	81 cm	13 cm
Normal	31 cm	50 cm	19 cm
Pentru contrast	36 cm	12 cm	32 cm

Soluțiile separate se conservă foarte bine.

Revelatori cu diaminofenol

Acești revelatori se recomandă în special la developarea copiilor. Se prepară în momentul utilizării. Rețetele sînt indicate în tabelul 5.

Tabelul 5

Rețeta revelatorilor cu diaminofenol

Substanța	Tipul de revelator					
	Atenuat		Normal		Contrast	
Diaminofenol, g	0,1	0,2	0,5	1	1,5	2
Sulfit de sodiu ahnidru, g	10	5	3	3	2	2

Se adaugă apă pînă la 100 cm^3.

Scanned with OKEN Scanner

Revelatori speciali

Revelator pentru developare lentă — Kodak D 61—6

Bisulfit de sodiu soluţie	20 cm³
Metol	10 g
Sulfit de sodiu	320 g
Hidrochinonă	19 g
Carbonat de sodiu	38 g
Bromură de potasiu	6 g

Se completează cu apă distilată pînă la 1 l.

3.2. Developarea ultrarapidă

Durata de developare la utilizarea acestei reţete este de 10 s, la temperatura *t* cuprinsă între 18 şi 20°C. Se lucrează în două băi, folosind următoarele soluţii:

Soluţia A

Sulfit de sodiu	25 g
Hidrochinonă	50 g

Se completează cu apă distilată pînă la 1 l.

Soluţia B

Potasă caustică	300 g
Bromură de potasiu	1 g
Safranină	0,2 g

Se completează cu apă distilată pînă la 1 l.

Developarea se face ţinînd filmul 8 s în soluţia *A*, apoi 2 s în soluţia *B*.

Această reţetă dă rezultate pozitive numai la reproduceri cu contrast puternic.

Este bine să nu fie folosită decît în scopuri foarte urgente.

Revelator pentru clişee foarte puţin expuse (Kodak-D-82)

În microfotografie, ca şi în fotografia normală, se întîmplă deseori să avem de-aface cu clişee insuficient expuse, din cauza unor expuneri necorespunzătoare sau a folosirii unor surse de iluminare prea slabă.

Scanned with OKEN Scanner

O rețetă care poate fi utilizată pentru aducerea la normal a imaginii este următoarea:

Metol	15 g
Sulfit de sodiu	50 g
Hidrochinonă	15 g
Sodă caustică	10 g
Bromură de potasiu	10 g
Alcool metilic	50 cm³

Se completează cu apă distilată pînă la 1 l.

Developarea se face timp de 5 min la temperatura de 18°C.

Soluția nu se poate conserva.

Revelatorul își păstrează proprietățile timp de două zile în flacon și două ore în cuvă.

Revelator pentru granulație fină (Kodak D-76)

Metol	2 g
Hidrochinonă	5 g
Sulfit de sodiu anhidru	100 g
Borax	8 g
Acid boric, cristale	8 g

Se completează cu apă pînă la 1 l.

Cînd acest preparat trebuie folosit imediat după pregătire, se adaugă în produsul final 0,25 g bromură de potasiu. Durata developării este de 10—20 min la o temperatură de 20°C. Nu este necesară prelungirea timpului de expunere.

Prezența tamponului borax — acid boric asigură o activitate constantă și o bună conservare. Acest revelator poate fi conservat cîteva săptămîni în sticle bine astupate.

Un litru este suficient pentru developarea a 0,5 m² suprafață sensibilă, echivalentă cu 12—15 m lungime de film de 35 mm.

Revelator cu granulație foarte fină

Metol	7,5 g
Sulfit de sodiu anhidru	100 g
Metabisulfit de potasiu	15 g

Se completează cu apa distilată pînă la 1 l.

Scanned with OKEN Scanner

Durata developării este de 18 minute la temperatura de 18°C.

Asigură o granulație foarte fină, reducînd însă puternic sensibilitatea.

Folosirea acestui revelator cere, în prealabil, o prelungire cu 50% a timpului de expunere. Un litru este suficient pentru developarea a șase rolfilme tip Leica, a 16 m fiecare.

Este necesar ca la fiecare nou film durata developării să fie prelungită cu 15%.

Revelator cu granulație extrafină

Parafenil diamin	10 g
Metol	5 g
Sulfit de sodiu anhidru	60 g
Fosfat trisodic	2 g
Bromură de potasiu	1 g

Se completează cu apă distilată pînă la 1 l.

În acest caz developarea durează 5—15 min, la o temperatură de 18°C a soluției.

Granulația obținută este extrem de fină, însă timpul de expunere trebuie mărit de 3—4 ori.

În general, temperatura băilor de developare joacă un mare rol. Din tabelul 6 reiese variația timpului de developare în raport cu temperatura:

Tabelul 6

Variația timpului de developare în raport cu temperatura

Materialul de fotografiat	Temperatura		
	15°C	18°C	21°C
Plăci	8 min	6 min	5 min
Peliculă	6 min	4 min	3 min
Film de 35 mm	30 min	20 min	10 min

Scanned with OKEN Scanner

Cînd dorim să oprim imediat acțiunea revelatorului, clișeul se introduce timp de un minut într-o baie de oprire acidă, formată dintr-o soluție de acid clorhidric (15 cm^2 la 1 l de apă) sau acid acetic (soluție 20 cm^3 la 1 l de apă).

3.3. Fixarea

Materialele fotografice negative se fixează mai repede decît cele pozitive. Viteza de fixare depinde și ea de temperatura băii, de epuizarea soluției de fixare precum și de agitarea clișeului în baie.

În cazul în care materialul fotografic a fost nelucrat în prealabil într-o soluție energică, este necesară trecerea lui într-o baie intermediară (fie de apă, fie acidă), înainte de fixare.

Fixarea de lungă durată strică materialul fotografic printr-o atenuare a înnegririi imaginii developate. Cea mai simplă rețetă de fixare este următoarea:

Hiposulfit de sodiu . . . . . 400 g

Se completează cu apă pînă la 1 l.
Într-un litru se tratează 70 negative sau 45 copii foto pe hîrtie 9 X 12 cm.

Fixator acid standard

Hiposulfit de sodiu . . . . . 200 g
Metabisulfit de potasiu . . . . . 25 g

Se completează cu apă pînă la 1 l.

Unii autori (Windisch) recomandă și adăugarea a 1 cm^3 de acid acetic.

Fixator acid

Este de remarcat ca acest fixator să fie folosit după baia de oprire:

Hiposulfit de sodiu . . . . . 250 g
Sulfit de sodiu anhidru . . . . . 10 g
Bisulfit de sodiu la 35° . . . . . 50 cm^3

Se completează cu apă pînă la 1 l.

Scanned with OKEN Scanner

Fixator rapid

Hiposulfit de sodiu	300 g
Metabisulfit de potasiu	35 g
Clorură de amoniu	40 g

Se completează cu apă pînă la 1 l.

Nu se va ține materialul prea mult timp în acest fixator. Negativele și copiile fotografice tratate cu soluții de fixare rapidă necesită o spălare mai îndelungată în apă, față de celelalte materiale tratate cu soluții de fixare normale sau acide.

3.4. Spălarea

Spălarea materialelor se efectuează fie cu apă curgătoare, fie cu duș, fie prin înlocuirea succesivă a apei.

Temperatura optimă de spălare este de 14—18°C, iar durata variază între 10 și 60 min. Cantitatea necesară de apă este de circa 200 cm^3/dm^2 de emulsie.

Viteza de spălare a copiilor fotografice pe hîrtie este mult mai mică din cauza capacității mult mai mari de reținere a sărurilor solubile pe care o are fibra de hîrtie.

3.5. Uscarea

Negativele de sticlă se usucă pe suporți speciali, iar peliculele sînt suspendate cu ajutorul unor cîrlige speciale.

Copiile de hîrtie vor fi uscate și așezîndu-le pe tifon sau plase metalice, și prin aplicarea cu stratul de gelatină pe sticlă, obținîndu-se astfel o fotografie cu luciu. Se mai utilizează și uscătoarele electrice. Nu este permisă uscarea materialelor fotografice în camere cu praf sau cu curenți de aer care antrenează particulele de praf, făcîndu-le să adere la suprafața umedă a emulsiei.

Temperatura nu trebuie să depășească 25°C, întrucît emulsia se topește, iar clișeul se strică. În curent de aer, uscarea se poate face și la temperaturi pînă la 40°C, Uscarea în acest fel se efectuează în dulapuri speciale de uscare, unde materialul se usucă sub acțiunea unui curent de aer cald.

Scanned with OKEN Scanner

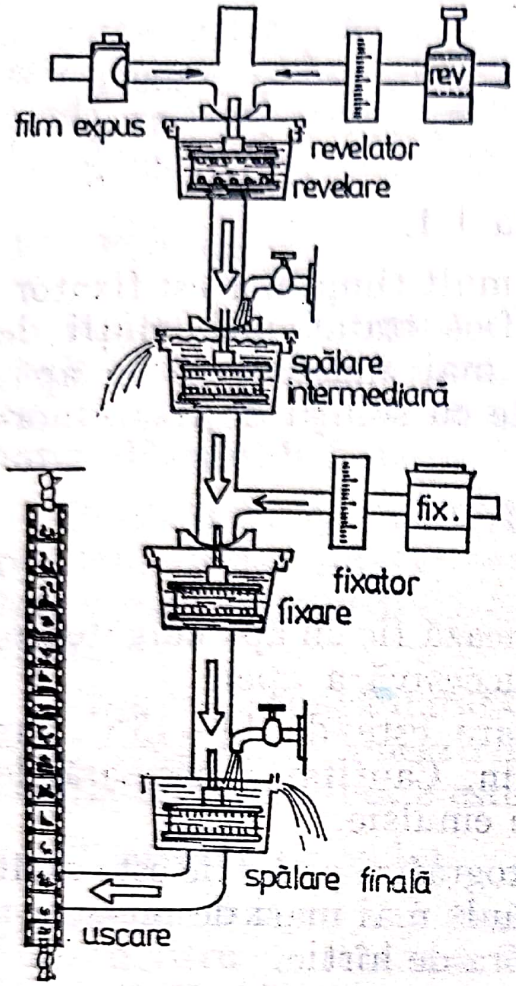


Fig. 26. Etapele procesului negativ (după A. Bubulac).

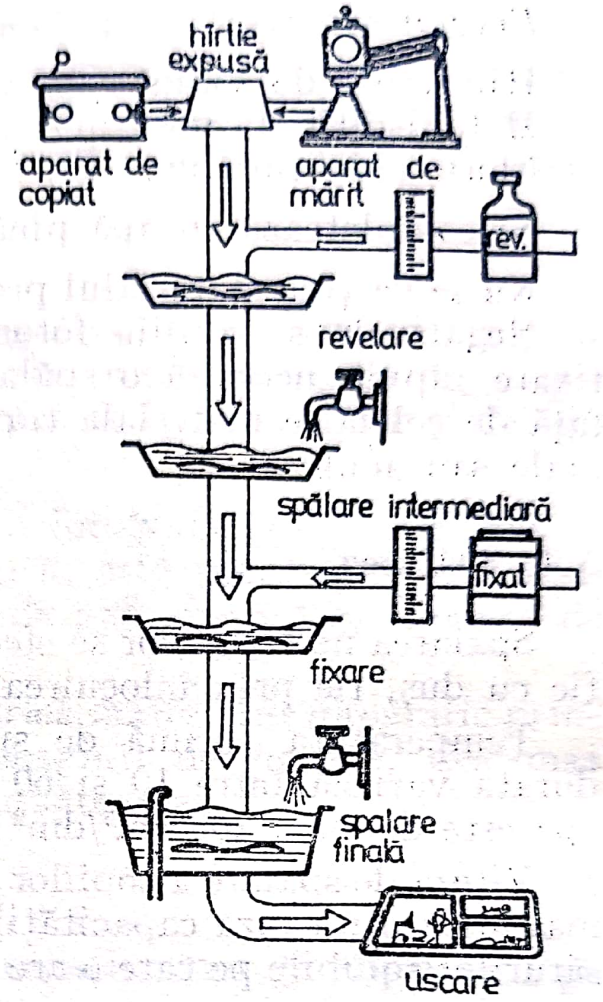


Fig. 27. Etapele procesului pozitiv (după A. Bubulac).

Filmul poate fi uscat în 5 min, prin introducerea într-o baie de alcool etilic.

Trebuie să se rețină însă că uscarea rapidă și energică mărește densitatea și contrastul imaginii fotografice (fig. 26, 27).

Capitolul

IV

Microfotografia

4.1. Factorii fotografici

Microfotografia este un auxiliar prețios de cercetare în orice ramură științifică în care se folosește microscopul.

Executarea unei fotografii la microscop este, înainte de toate, o problemă de *optică*, de *iluminare*, factorii geografici fiind de importanță secundară.

Obținerea unei bune microfotografii depinde de o serie de factori și anume:

— o iluminare constantă;

— o bună poziție a filamentului în raport cu colectorul;

— o așezare la distanță corespunzătoare a condensorului de la microscop;

— folosirea unor sisteme optice corespunzătoare;

— folosirea unor filtre adecvate pentru microfotografii;

— fixarea timpului de expunere.

4.1.1. Sursa de lumină (iluminarea)

Nerespectarea indicațiilor privind iluminarea provoacă neajunsuri din cauza neuniformității de iluminare rezultate.

Pentru ca în microfotografiere să se folosească o iluminare cît mai potrivită, se recurge la sistemul de iluminare cunoscut în literatură sub denumirea de „iluminarea Kohler" (fig. 28, *a*, *b*).

Scanned with OKEN Scanner

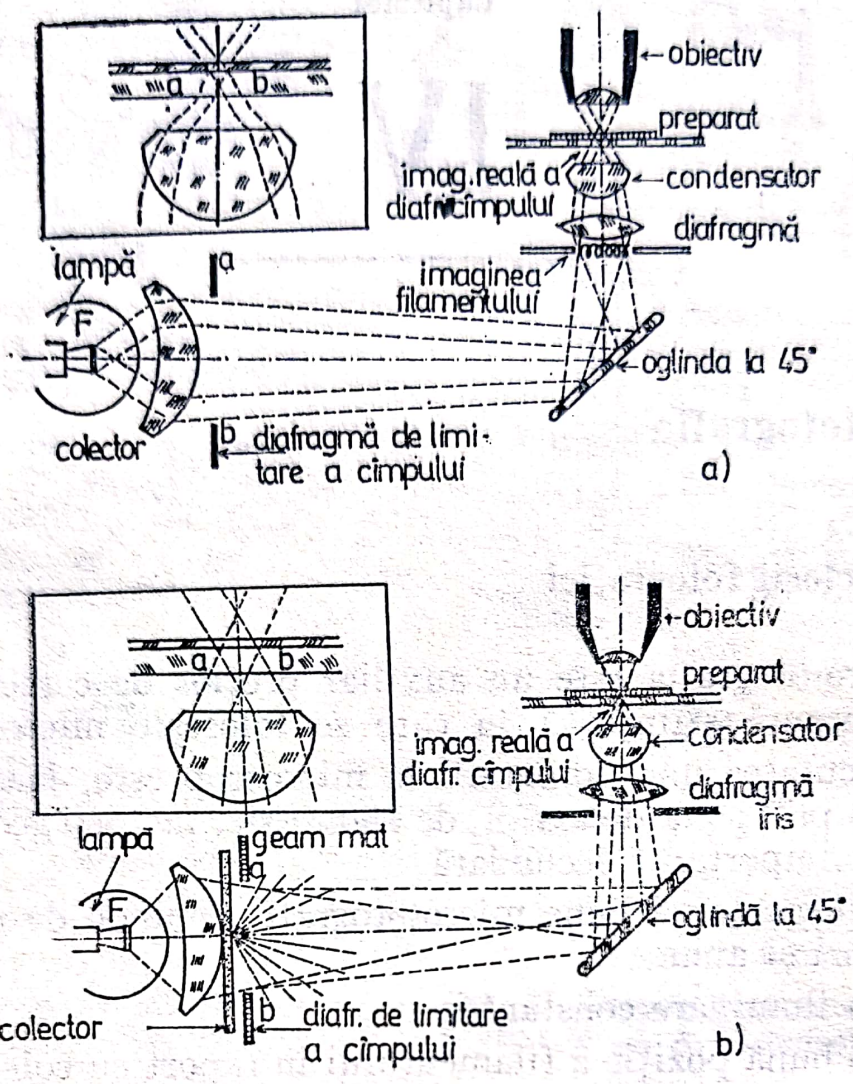


Fig. 28. Schema iluminării în microfotografie.
a, b — mersul razelor de lumină în iluminarea Kohler

În acest scop, se vor urma întrutotul indicațiile de mai jos:

— se așază aparatura pe o masă cu stabilitate perfectă, grea și cu o suprafață mată. Este bine ca suprafața masei să fie acoperită cu o foaie de cauciuc;

— nu se va instala microscopul în fața ferestrei. Încăperea se va alege astfel încît să se poată face întuneric deplin;

— sursa de lumină trebuie să fie constituită dintr-o lampă pe care am prezentat-o anterior, prevăzută cu diafragmă iris și geam mat.

Scanned with OKEN Scanner

În timpul lucrului se va ține seama de următoarele observații:

— imaginea sursei trebuie să se formeze în planul preparatului;

— suprafața iluminată nu trebuie să depășească întinderea cîmpului ce se studiază;

— condensorul se diafragmează puțin, cu 1/5—1/4 din deschiderea totală.

Reglarea permite obținerea unui cîmp perfect iluminat dacă se procedează așa cum vom prezenta în continuare:

— se așază sursa luminoasă la 30 cm de oglindă;

— se centrează imaginea filamentului lămpii în centrul oglinzii;

— se reduce la jumătate deschiderea diafragmei lămpii;

— se pune la punct imaginea filamentului lămpii, în mijlocul condensorului, închisă la maximum;

— se dirijează raza de lumină pe axa optică a microscopului, potrivind înclinarea oglinzii;

— se deschide diafragma lămpii;

— se introduce geamul mat în fața lămpii;

— se pune la punct microscopul pentru obținerea imaginii preparatului;

— se reglează în așa fel condensorul microscopului încît imaginea sticlei mate din fața lămpii să se formeze în planul preparatului. O linie trasată cu creionul pe geamul mat ușurează acest reglaj;

— se închide diafragma lămpii;

— se centrează cercul luminos în cîmp prin orientarea oglinzii, privind în microscop;

— se deschide diafragma lămpii;

— se privește în microscop închizînd diafragma lămpii pînă cînd imaginea luminoasă coincide cu cîmpul microscopului;

— se închide irisul condensorului cu 1/4 pînă la 1/5 din diametrul său. Pentru aceasta se scoate ocularul și se privește prin tubul microscopului. Lentila din spate a obiectivului va fi complet și uniform iluminată. Se închide treptat irisul, pînă cînd diametrul discului iluminat va fi redus la 3/4 pînă la 4/5 din valoarea inițială;

Scanned with OKEN Scanner

— se reglează intensitatea luminii cu ajutorul reostatului lămpii sau interpunînd diferite filtre.

Dacă se respectă aceste condiții de iluminare a preparatului la microfotografiere, se îndepărtează și lumina parazită, care provoacă multe neajunsuri.

4.1.2. Alegerea sistemului optic

Obiectivul

În microfotografie se preferă folosirea unui obiectiv apocromat de bună calitate. Este bine să avem la îndemînă un număr suficient de obiective, pentru a ne permite o întreagă gamă de combinații. Astfel, se pot folosi:

— obiective uscate — 6 X (0,15); 10 X (0,30); 20 X (0,65); 40 X (0,95), cu inel de corecție;

— obiective cu imersie în ulei — 60 X (1,0); 90 X (1,40); 120 X (130).

Ocularul

Ocularele ordinare (Huygens, periplan sau compensatoare) nu asigură obținerea unei bune imagini fotografice.

La aceste oculare claritatea în centru este bună, însă curbarea cîmpului este extrem de supărătoare, mai ales pentru preparatele microscopice de suprafață mare. Se pot totuși folosi combinațiile: oculare Huygens + acromatice slabe; periplan + acormatice medii; compensatoare + acromatice tari și apocromatice.

Cele mai folosite oculare speciale, calculate pentru microfotografii, sînt așa-numitele Holmas (Zeiss) sau Amphiplan (Bausch-Lomb). Acestea dau imagini foarte plane, astfel nu va mai apare curbura cîmpului. Sînt însă inutilizabile pentru observarea vizuală.

Acest tip de oculare speciale trebuie asociate cu obiective apocromatice, pentru că măresc, corijează și aplanează imaginea.

Ocularele de proiecție (proiective) dau rezultate bune cu obiectivele acromatice slabe și mijlocii.

Scanned with OKEN Scanner

Condensorul

Condensatorul Abbe cu două sau trei lentile nu este recomandabil, dînd o aberație mare. Dacă se lucrează în lumină monocromatică verde se pot folosi cu succes condensoarele aplanatice cu apertura 1,40.

Cînd dorim să obținem puteri de rezoluție foarte mari, vom lucra cu un condensor acromatic cu imersiune (apertura 1,30 sau 1,40).

Grosismentul

După fiecare microfotografie, determinarea scării este deosebit de importantă. O microfotografie lipsită de scară nu are nici o valoare științifică. Se știe că grosismentul microscopului este produsul dintre mărirea proprie a obiectivului și grosismentul ocularului. Grosismentul total nu este însă identic cu scara fotografiei. Folosim relația:

$$G_{foto} = G_{microscop} \cdot \frac{T}{250}$$

în care: T reprezintă lungimea în milimetri a camerei, respectiv distanța dintre ocularul microscopului și placa fotografică sau pelicula filmului.

În cazul folosirii dispozitivului Miflex, $T = 125$ mm, deci:

$$G_{foto} = n_{ob} \cdot 0{,}5.$$

În acest caz, folosind aceeași formulă, reiese clar că grosismentul fotografiei crește în raport cu lungimea camerei la aceeași pereche ocular-obiectiv.

4.1.3. Filtrele pentru microfotografiere

Pentru operațiile legate de microfotografiere, este necesară folosirea unei game întregi de filtre, pe care le indicăm în continuare:

— filtre neutre ce reduc iluminarea obiectivului, fără modificarea culorii;

— filtre colorate solide și lichide care sînt folosite pentru modificarea culorilor preparatului;

Scanned with OKEN Scanner

— filtre monocromatice care transmit o bandă spectrală limitată. Acestea se folosesc în scopul de a se elimina spectrul secundar al obiectivelor acormatice și a se ameliora claritatea imaginii (de exemplu filtrul verde izolează banda de 5 461 Å);

— filtre infraroșii ce nu lasă să treacă decît lumina cu lungimea de undă $\lambda = 0{,}7\ \mu$, permițînd fotografierea unor obiecte opace la lumină obișnuită;

— ecrane antiultraviolet ce opresc radiațiile ultraviolete date de o lampă de cuarț, de exemplu, pentru protejarea microorganismelor vii;

— ecrane anticalorice care opresc razele infraroșii. Ele se utilizează în special acolo unde trebuie protejate preparatele supuse unei iluminări prea intense;

— filtrele polarizate (polaroid) care sînt utilizate cîteodată în rolul nicolilor, pentru cercetări în lumină polarizată. Filtrele din sticlă sînt mai comode și mai practice.

Se mai utilizează filtre de gelatină și filtre lichide.

Gelatina se deteriorează însă din cauza căldurii radiate de sursa de lumină.

Aceste ultime tipuri de filtre nu se vor monta niciodată prea aproape de sursa de lumină sau în planul imaginii sursei.

Pentru ca o culoare determinată să fie cît mai puțin supărătoare, trebuie ca preparatul să fie fotografiat cu radiații avînd lungimea de undă curpinsă în banda de absorbție a colorantului folosit. Prin urmare, trebuie să se cunoască benzile de absorbție spectrală ale coloranților biologici mai des utilizați precum și curbele de transmisie ale filtrelor disponibile.

În fig. 29 sînt prezentate benzile de absorbție ale celor mai uzuali coloranți precum și curbele specifice filtrelor care se găsesc cu mai multă ușurință în țara noastră.

4.1.4. Determinarea timpului de expunere

În microfotografiere este mult mai dificil să se determine cu precizie timpul de expunere, decît în fotografia normală. Totdeauna va fi necesară efectuarea mai multor expuneri la o intensitate absolut identică a luminii, iar filmele sau plăcile trebuie developate în condiții absolut identice.

Scanned with OKEN Scanner

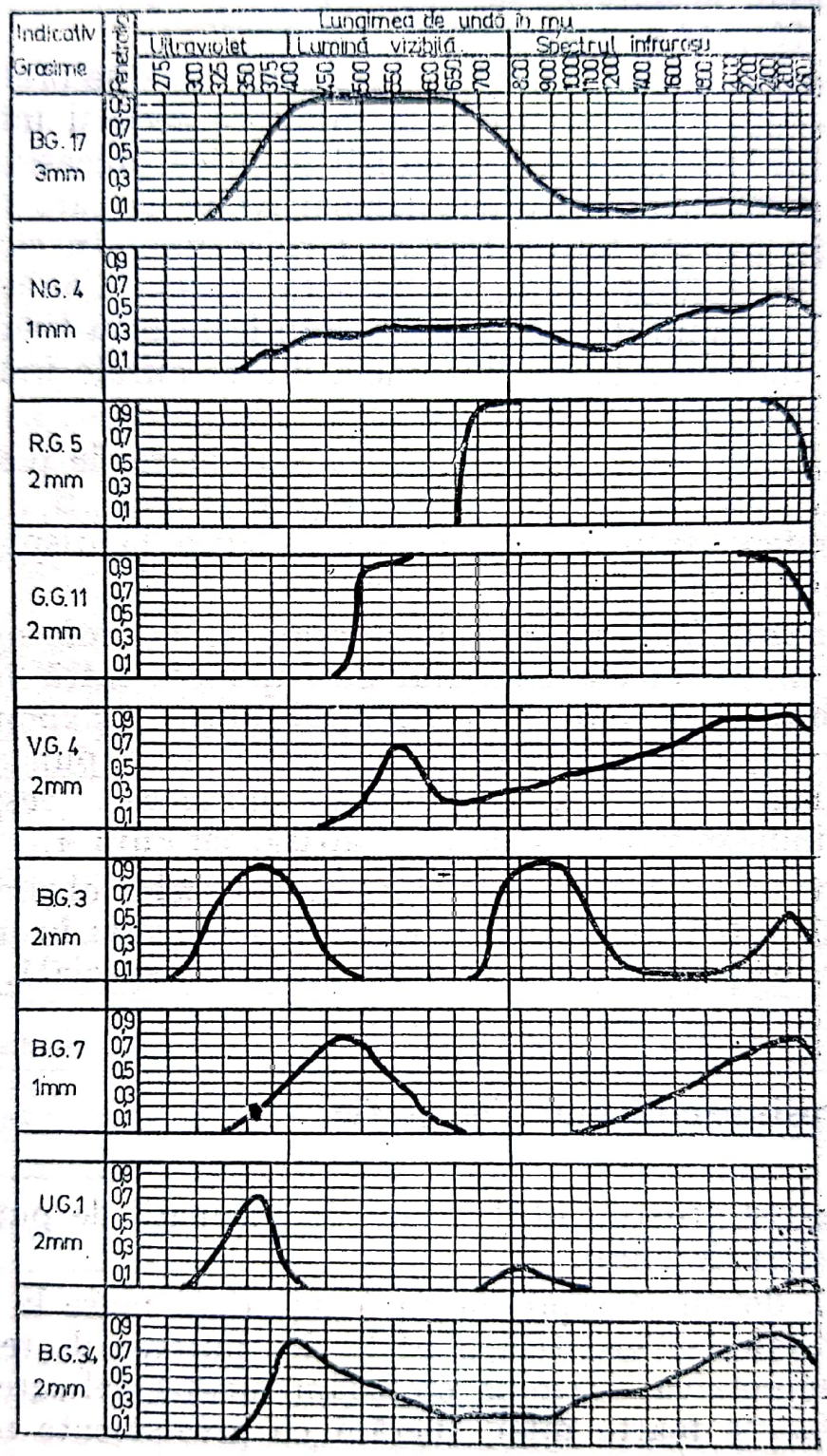


Fig. 29. Curbele de transparență ale filtrelor pentru microfotografii.

Scanned with OKEN Scanner

Se va fixa un timp minim de expunere, de exemplu 2s, iar clișeele următoare se vor expune în progresie astfel: 4s, 8s, 16s, 32 s.

Se alege cel mai bun clișeu din serie, care se prelucrează, iar în expunerile următoare se folosește aceeași intensitate de lumină, lucrîndu-se în condiții identice. Această metodă se aplică în cazul utilizării dispozitivelor la care se găsesc adaptate aparate fotografice de format mic. În cazul aparatelor de format mare, ca Exacta Varex, Contax, Exa, Practica, timpul de expunere se stabilește prin fixarea unei manete indicator la nivelul uneia dintre cifrele indicate pe un disc mobil.

Dacă expunerea trebuie să fie mai mare de o secundă, maneta indicator se fixează în dreptul literei „B". În acest caz, pentru expunere este necesar a avea la dispoziție un cronometru sau un ceas cu secundar.

În cazul folosirii exponometrelor la microfotografiere, pentru determinarea timpului de expunere intră în calcul și sensibilitatea emulsiei, a filmului folosit. Exponometrul se potrivește la deschiderea 8; timpii de expunere astfel determinați sînt valabili pentru expunerea respectivă, împărțindu-se valoarea dată de aparat cu cifra 4.

Expunerea precum și prelucrarea clișeelor obținute este identică în toate cazurile, în afară de fotografia în infraroșu și în culori, unde este necesară o tehnică specială.

4.2. Grosismentul microfotografiei

Alegerea grosismentului este determinată de puterea de rezoluție și de cîmp.

Dacă dorim să reproducem o suprafață mare la un grosisment mic, se sacrifică o parte din puterea de rezoluție; dacă dimpotrivă, vrem să efectuăm lucrări delicate asupra unor obiecte foarte mici, lucrăm cu grosismente maxime.

Folosind formula $\left(G_{foto} = G_{microscop} \cdot \frac{T}{250}\right)$ în cazul folosirii camerei fotografice Zeiss Standard sau al dispozitivului Miflex, vom avea valorile din tabelul 7.

Tabelul 7

Grosistemul microfotografiei

G_{ob}	G_{oc}	T	Mărire de copiere	G_{total}
40 X	8 X	500 mm	1 X	640 X
40 X	15 X	270 mm	1 X	640 X
40 X	8 X	125 mm	4 X	640 X

Prima combinație este logică, iar a treia foarte practică, permițînd utilizarea economică a aparatelor de format mic.

Emulsiile cele mai practice folosite în diferite categorii de lucrări sînt date în tabelul 8.

Tabelul 8

Tipuri de emulsii folosite la diferite subiecte

Subiecte	Emulsii
Histologie, microfotografii tehnice	Pancromatice cu granulații fină și contrast
Entomologie	Ortocromatice
Botanică	Ortocromatice cu granulație fină
Instantanee (microorganisme vii)	Pancromatice ultrarapide

În ce privește puterea de rezoluție a diferitelor categorii de emulsii, dăm următoarele date:

Materialul de reproducere . . . . circa 100 linii/mm
Filme pozitive . . . . . 70 linii/mm
Filme cu granulație fină 10/10 DIN 75 linii/mm
Material negativ 16—17/10 DIN . 55 linii/mm

Scanned with OKEN Scanner

În tabelele 23—27 sînt reproduse caracteristicile materialelor Agfa, folosite în microfotografiere, și alte date practice.

4.3. Practica microfotografierii

Pentru obținerea unei microfotografii de bună calitate, trebuie ca, pe lîngă condițiile și factorii amintiți în capitolele anterioare, să se acorde o atenție deosebită pregătirii preparatului microscopic.

O microfotografie înregistrează toate defectele, inclusiv cele care scapă ochiului.

Preparatul trebuie să fie foarte subțire. Lama va avea grosimea de 0,8—1 mm, iar lamela va avea o grosime de 0,15—0,18 mm.

Alegerea sistemului optic se va face în funcție de subiect și de rezultatul dorit: puterea de rezoluție, profunzimea sau cîmpul mare.

Pentru un preparat botanic (v. planșele I, II, III) secționat, de exemplu, se va alege un obiectiv cu apertura mică, iar diafragma condensorului va fi deschisă puțin; se va utiliza un ocular puternic.

La fotografierea bacteriilor, obiectivul va fi cu imersie și prezentînd o apertură mare, iar condensorul va fi puțin diafragmat.

Pentru secțiuni și frotiuri de suprafață mare pe lame, se vor folosi obiective speciale de cîmp plan, cu oculare adecvate.

După condițiile în care se pot efectua microfotografiile, acestea se clasifică în:

— microfotografii în alb-negru;
— microfotografii în culori.

Atît unele cît și celelalte se execută în următoarele condiții de iluminare:

— iluminarea obiectului prin transparență, în cazul studierii preparatelor transparente (frotiuri microscopice, diverse secțiuni biologice etc.);

Scanned with OKEN Scanner

— iluminarea obiectului prin incidență, în cazul studierii corpurilor opace sau a structurii cristaline a metalelor.

Razele de lumină cad fie perpendicular pe suprafața de cercetare, printr-un sistem optic special al microscopului, fie oblic,

În afara fotografierii preparatelor în cîmp luminat, prezentate anterior, mai sînt cunoscute și alte metode speciale de microfotografiere, cum sînt: microfotografierea în cîmp întunecat, microfotografierea prin contrast de fază, microfotografierea în lumină polarizată, microfotografierea în lumină fluorescentă (ultraviolet), microfotografierea în infraroșu, microfotografierea în cazul luminii incidente și microfotografierea color.

4.4. Microfotografierea în cîmp întunecat (cu fond negru)

Microfotografierea în cîmp întunecat (sau cu fond negru) se realizează la microscopul cu fond negru, care se deosebește de microscopul fotonic prin fapul că razele de lumină nu ajung direct în obiectiv, iar imaginea este creată numai de razele reflectate, refractate sau difractate.

Principiul acestei metode de observare are la bază utilizarea unui fenomen evidențiat în mod curent în natură, fenomenul Tyndal. Această metodă a fost elaborată de savantul austriac R. ZIGMOND (fig. 30).

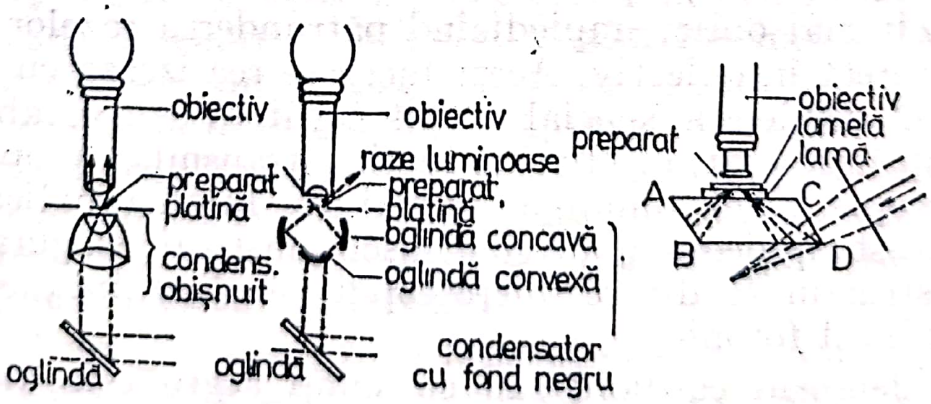


Fig. 30. Schema microscopului fotonic (*a*) și cu fond negru (*b*) (după Nougarede, 1969).

Scanned with OKEN Scanner

Cînd dimensiunile particulelor scad sub 200μ, microscopul cu fond negru pune în evidență numai ceea ce în fizică se numește o imagine cu difracție, fără nici o indicație asupra formei, mărimii sau structurii obiectului.

Prin această metodă pot fi puse în evidență particule ultramicroscopice, mai mici față de capacitatea de separare a obiectivului care la microscopul fotonic nu pot fi observate.

Pentru a obține o imagine corespunzătoare la microscopul cu cîmp întunecat, trebuie să respectăm o serie de reguli, dintre care cele mai importante sînt:

— lichidul de imersie și preparatul nu trebuie să conțină bule de aer; mediul obișnuit de includere este apa;

— lamele și lamelele recomandate sînt cele cu grosimea de 0,8—1,2 mm și respectiv 0,17 mm. Acestea trebuie să fie perfect curățate, deoarece orice particulă materială dispersează lumina, ceea ce este nedorit, îngreunînd observarea:

— preparatele trebuie să fie foarte subțiri (unistratificate);

— centrarea luminii să fie perfectă, respectînd principiul lui Keler;

— se utilizează în special obiectivele uscate pînă la apertura de 0,85, iar dintre cele cu imersie numai cele speciale de 90 X și 60 X, prevăzute cu diafragma iris.

Diafragma iris a obiectivului cu imersie este absolut necesară pentru obținerea cîmpului întunecat, întrucît apertura normală a acestui obiectiv depășește apertura conului de lumină a condensorului special de cîmp întunecat;

— iluminarea preparatului se face în exclusivitate lateral și cît mai oblic, împiedicînd pătrunderea razelor luminoase direct în obiectiv. Acest lucru se realizează cu ajutorul unui condensor special numit cardioid sau paraboloid, cu cîmp întunecat, ce elimină lumina transmisă, preparatul microscopic fiind iluminat numai de lumina oblică. De fapt, acest tip deosebit de condensor constituie singura diferență structurală dintre microscopul cu cîmp întunecat și microscopul fotonic.

Condensorul cardioid sau cu cîmp negru este alcătuit dintr-o oglindă convexă centrală, care dispersează fasciculul de raze paralele la două oglinzi concave laterale. Acestea

Scanned with OKEN Scanner

primesc razele luminoase dispersate de oglinda convexă și le transmit la preparat, luminîndu-l foarte oblic, fără ca vreo rază să pătrundă direct în obiectiv. Ca urmare, în tubul microscopului și la ochiul observatoului ajung numai acele raze care sînt refractate sau difractate de particulele din cîmp al căror indice de refracție este mai mare decît al mediului de imersie. Obiectele apar cu un contur strălucitor pe un fond întunecat și li se poate analiza forma și dimensiunea, dar nu și structura.

La acest tip de microscop se pot atașa sisteme de fotografiere utilizate la microscopul fotonic, obținînd imagini corespunzătoare (alb pe fond negru).

Executarea examenului cu fond întunecat

Fixăm un condensor cardioid sau paraboloid în mansonu de metal, înlocuind condensorul obișnuit. Se coboară puțin condensorul, apoi se pune o picătură de ulei de cedru pe lentila superioară a condensorului. Se așază lama cu preparatul proaspăt, de pildă o picătură de apă cu colonii de Nostoc commune (cleiul pămîntului) (v. planșa VI), o picătură dintr-o cultură bacteriană de leptospire, între lamă și lamelă, după care se ridică condensorul încet pînă cînd picătura de ulei de cedru vine în contact cu fața inferioară a lamei cu preparatul de examinat. Pentru a evita formarea bulelor de aer, este recomandabil să așezăm o picătură de ulei de cedru și pe fața inferioară a lamei cu preparatul de examinat și în acest fel, prin ridicarea condensorului, contopim cele două picături de ulei de cedru.

Se pune la punct imaginea, la început ca un obiectiv slab 3 X sau 20 X. Dacă oglinda este bine orientată, trebuie să se vadă în centrul cîmpului o pată luminoasă. Această pată, care corespunde imaginii sursei de lumină, trebuie să fie adusă cu ajutorul mișcărilor oglinzii în centrul cîmpului, iar prin ușoare mișcări pe verticalitate ale condensorului trebuie micșorată la maximum. Dacă preparatul nu se găsește în planul orizontal, ci mai jos sau mai sus, pata luminoasă ia o formă inelară (I. Ieremia).

Cînd imaginea sursei de lumină este centrală și pusă la punct corect, se pune o picătură de ulei de cedru pe lamelă și se examinează cu obiectivul de imersie.

Scanned with OKEN Scanner

Atragem în mod deosebit atenția asupra faptului că toate condensoarele de cîmp întunecat au un focar foarte scurt, de maximum 1,1 mm, astfel încît ele nu pot fi utilizate decît dacă lamelele de sticlă sînt foarte subțiri, grosimea maximă a lamelei 0,8—1,2 mm. În ceea ce privește obiectivele care pot fi utilizate pentru examenul în cîmp întunecat, recomandăm toate obiectivele uscate pînă la apertura de 0,85, iar pentru imersie obiectivele speciale 90 X cu diafragmă iris și 60 X ($A = 0,1$) cu diafragmă iris.

Apoi după ce am examinat preparatul, avînd imagini clare în cîmpul întunecat, se atașază dispozitivul Miflex sau tubul intermediar cu aparatul Exacta Varex. Pentru obținerea de microfotografii se folosește aceeași tehnică prezentată la microscopul optic (fotonic).

4.5. Microfotografia în contrast de fază

În biologie, cele mai multe preparate microscopice sînt atît de uniform transparente, încît structurile lor rămîn invizibile cu microscopul obișnuit, dacă nu le colorăm.

Microscopul cu contrast de fază permite studiul lor fără nici un artificiu de culoare. Întrucît fixarea prealabilă a preparatului, deci omorîrea celulelor, nu mai este necesară, se pot urmări direct sub obiectivul microscopului procese vitale în desfășurare.

În aceste cazuri, interpretarea imaginii trebuie făcută cu mult discernămînt, întrucît prin procedeul prin care se obține contrastul intervenindu-se în focarul posterior al obiectivului, în locul unde se formează imaginile de difracție se pot produce falsuri de imagini.

În general, aceste falsuri se limitează la apariția unui halo în jurul obiectelor, așa-numitul fenomen de inversiune, pete clare în interiorul unor obiecte care ar trebui să fie uniform întunecate.

Cu microscopul fotonic, structurile vizibile sînt perceptibile grație faptului că reținînd atîta lumină încît iau naștere scăderi de intensitate luminoasă (contraste) suficiente pentru a fi percepute.

Scanned with OKEN Scanner

Aceste scăderi de intensitate se datoresc, de fapt, scăderii de amplitudine a vibrațiilor.

Preparatele microscopice care dau asemenea imagini se numesc „preparate de amplitudine". Acesta este cazul preparatelor microscopice transparente, dar colorate. Preparatele de amplitudine dau naștere în planul focal și în cel al imaginii unor serii de maxime și minime luminoase, deci unor variații de intensitate luminoasă a căror distribuție în spațiu corespunde distribuției structurilor obiectului.

În cazul preparatelor microscopice transparente și incolore, viteza de propagare a vibrațiilor luminoase este încetinită în medii mai dense cu indice de refracție mai mare sau în porțiunile mai grose în raport cu porțiunile învecinate mai subțiri ale obiectului, amplitudinea odulațiilor rămînînd însă constantă.

Preparatele microscopice care întîrzie în anumite locuri mersul luminii, fără a provoca scăderi de intensitate luminoasă, se numesc „preparate de fază". Atît ochiul cît și placa fotografică sînt insensibile la diferențe de fază, percep numai diferențe de intensitate; de aceea, preparatele de fază nu dau imagini vizibile. Întrebarea care se pune este dacă variațiile de fază survenite în mersul razelor nu pot fi transformate în variații de intensitate luminoasă. În caz afirmativ, imaginea vizibilă a preparatului de fază ar deveni vizibilă.

Problema a fost rezolvată în anul 1932 de fizicianul olandez F. Zernicke.

Vibrațiile care provin de la detaliile preparatului, mai refrigerente sau mai groase, sau cele întîrziate în raport cu vibrațiile ce provin din porțiunile înconjurătoare și reprezintă lumina directă, sînt pe de o parte vectorial descompuse în vibrații de aceeași fază și amplitudine cu a luminii directe, iar pe de altă parte în vibrații care reprezintă lumina difractată și care sînt întîrziate cu 1/4 din lungimea de undă. Pentru a putea acționa este necesar să se separe, în focarul posterior al obiectivului, locul prin care trece lumina directă de locul prin care trece lumina difractată.

Aceasta se realizează limitînd în dreptul diafragmei de apertură al condensorului, și deci și în focarul posterior al obiectivului, secțiunea fascicolului de luminare la un cerc

Scanned with OKEN Scanner

cît mai îngust. Astfel, dacă acoperim acum restul suprafeței lentilei obiectivului, care se află în focarul posterior, cu un strat transparent dintr-o anumită substanță, cu alt indice de refracție decît al sticlei, el are menirea să întîrzie razele difractate cu încă 1/4 din lungimea de undă.

Prin interferență, în planul imaginii, amplitudinea razelor directe va fi micșorată în dreptul detaliilor mai refrigerente sau mai groase, care vor apărea mai întunecoase decît mediul înconjurător, devenind astfel vizibile (fig. 31).

Pentru a mări contrastul, întrucît amplitudinea razelor difractate este mică, se operează de asemenea o reducere a amplitudinii razelor directe în dreptul cercului prin care

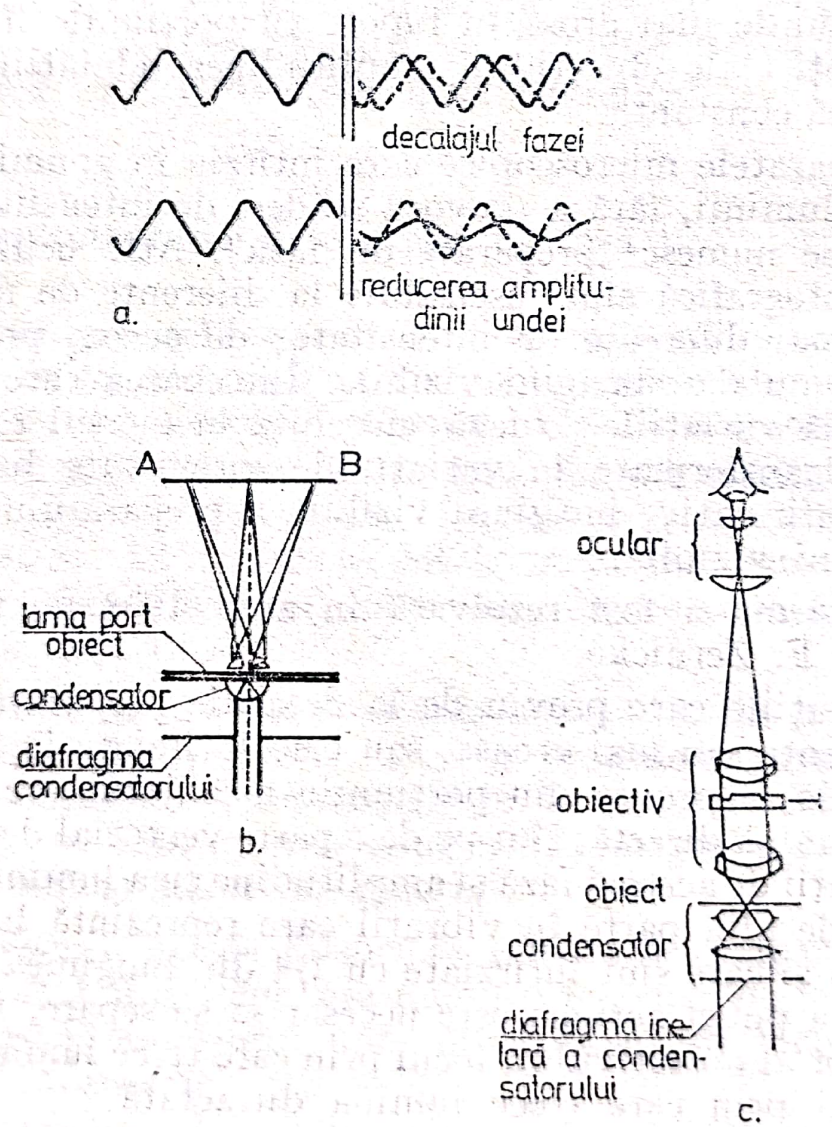


Fig. 31. Schița microscopului cu contrast de fază (Nougarede, 1969).

a — amplitudinea razelor directe, b, c — direcția razelor în microscopul cu contrast de fază.

Scanned with OKEN Scanner

trec, depunînd pe acest cerc un strat metalic absorbant, semitransparent.

În aceste condiții, imaginea de fază este transformată într-o imagine de amplitudine cu contraste viguroase, detaliile obiectelor studiate devenind perfect vizibile, putînd fi de asemenea înregistrate clar pe placa fotografică.

Punerea în funcție a microscopului cu contrast de fază și obținerea unor microfotografii comportă următorii timpi, sau etape:

— obiectivele obișnuite ale microscopului optic se înlocuiesc cu obiectivele de contrast de fază. Acestea au pe montura lor marcate literele F sau pH (phase). Dacă privim prin ele se vede plăcuța inel a lui Zernicke;

— condensorul obișnuit se înlocuiește cu condensorul cu revolver, destinat examenului cu contrast de fază (fig. 32).

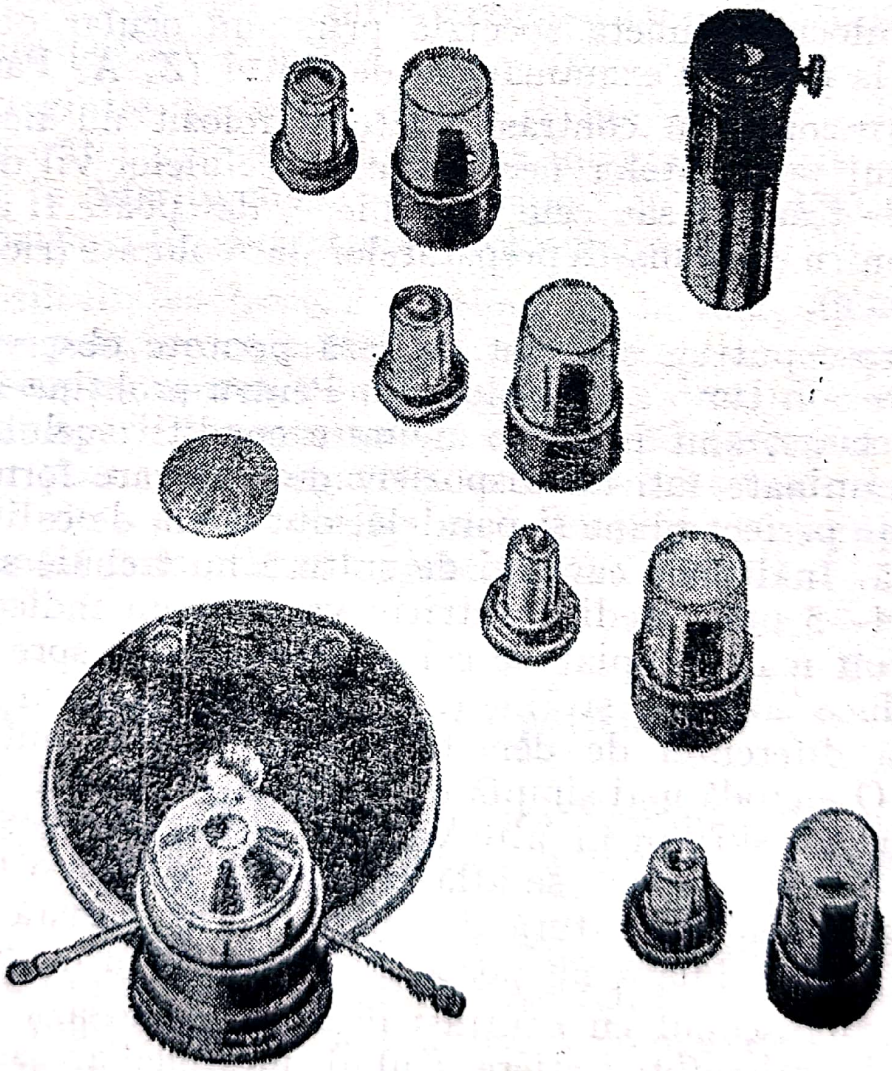


Fig. 32. Condensoare cu distanța focală mare pentru contrast de fază.

Scanned with OKEN Scanner

Revolverul se învîrtește pînă cînd numărul diafragmei inelare a condensorului corespunde cu numărul obiectivului întrebuințat;

— preparatul de examinat se așază pe platina microscopului iar tubul microscopului se coboară pînă la poziția de punere la punct;

— se introduce în tubul microscopului, în locul ocularului, o lunetă specială cu viză care se află în cutia microscopului; aprindem lumina și dăm oglinzii poziția potrivită; privim prin lunetă, mișcînd segmentul ei superior, pînă se văd clar inelul luminos al diafragmei condensorului și inelul întunecos al marginii plăcuței de fază;

— învîrtim vizele oblice ale condensorului pentru contrast de fază, pînă cînd cele două inele apar exact concentrice;

— înlocuim luneta specială printr-un ocular obișnuit. Punem la punct și examinăm ca de obicei (Z. A. Paușeva).

Microscopul cu contrast poate fi folosit nu numai la examenul preparatelor necolorate, al celulelor vii din culturile de țesuturi sau cele microbiene, dar poate fi avantajos și pentru examinarea preparatelor slab colorate (rickettsii, treponeme).

Microscopul cu contrast de fază permite observarea și urmărirea în timp a celulelor vii. Pentru a obține însă rezultate bune, sînt necesare anumite condiții: celulele trebuie examinate într-un dispozitiv de cultivare format din suprafețe perfect plane și paralele, din sticlă de calitate superioară. Înălțimea camerei de cultură nu trebuie să depășească 4—5 mm. Mediul nutritiv va avea un indice de refracție cît mai apropiat de cel al citoplasmei, spre a evita sau reduce zona de strălucire care apare în jurul celulei, datorită diferenței de densitate între mediul nutritiv și celulă. O metodă mai simplă este de a face culturile pe lame și tuburi Barski sau în alte vase de cultură și de a aplica lamela cu fața pe care se află cultura în jos, pe o lamă pe care s-a depus o picătură de mediu; prin această metodă însă cultura celulară nu poate fi observată în evoluție.

La microscopul cu contrast de fază se atașază dispozitivele de microfotografiere (tubul intermediar sau Miflexul) cu apa- ratul Exacta Varex, Kiev, Practica, Exa

Scanned with OKEN Scanner

etc., obținînd diverse stadii clare ale culturilor de celule vii, sau celule slab colorate (v. planșa VII).

Un procedeu de contrast de fază negativ a fost imaginat de Wilska, denumit microscopul anoptral, în care imaginile apar clare pe un fond mai întunecat brun, Aici inelul absorbant are o transparență extrem de mică, de numai 10%, ceea ce conferă metodei o sensibilitate foarte ridicată, putîndu-se astfel decela detalii care diferă foarte puțin de mediul înconjurător ca indice de refracție sau grosime.

O altă metodă de contrastare este cea care utilizează *microscopia cromoanoptrală*, care, spre deosebire de contrastul de fază clasic, dă în același timp atît imagini negative cît și pozitive prin simpla schimbare a punerii la punct cu viza micrometrică. În linii mari, contrastul cromoanoptral este un contrast de fază negativ combinat cu un contrast de defocalizare pozitiv colorat.

Imaginile negative sînt mai luminoase decît cîmpul înconjurător care este galben iar imaginile pozitive sînt colorate în diferite culori vii în raport cu proprietățile optice de refrigerență și grosime a obiectelor.

Posibilitatea trecerii continue de la imaginile negative la cele pozitive colorate, în cadrul aceluiași dispozitiv de microscopie, ușurează mult perceperea detaliilor extrem de fine iar apariția simultană în cîmpul microscopului a imaginilor pozitive și negative, a detaliilor situate în planuri diferite determină apariția unei imagini mai sintetice, viu și nuanțat colorată, a obiectelor studiate.

4.6. Microfotografia în lumină polarizată

Microscopul cu lumină polarizată permite efectuarea unor cercetări asupra structurii interne a materiei. În biologie s-au obținut date foarte prețioase despre constituenții cloroplastelor, despre structura cristalină a granulelor de amidon, a fusului mitotic, a proteinelor fibrilare etc; în mineralogie, el este folosit pentru determinarea compoziției rocilor și a mineralelor metalifere, iar în chimie servește la analiza calitativă a unor infime cantități de substanțe.

Scanned with OKEN Scanner

Microscopul cu lumină polarizată sau polarizant reprezintă o variantă a microscopului optic sau fotonic, care în locul luminii normale utilizează lumina polarizată (fig. 33).

Lumina polarizată se deosebește de lumina normală prin faptul că vibrațiile sale se efectuează într-un singur plan, față de prima, la care vibrațiile se propagă sub forma de unde transversale în toate direcțiile.

Microscopul cu lumină polarizată realizează tocmai acest fenomen de polarizare a luminii datorită unor dispozitive de polarizare și analizare a luminii, cunoscute sub denumirea de polarizoare sau Nicoli.

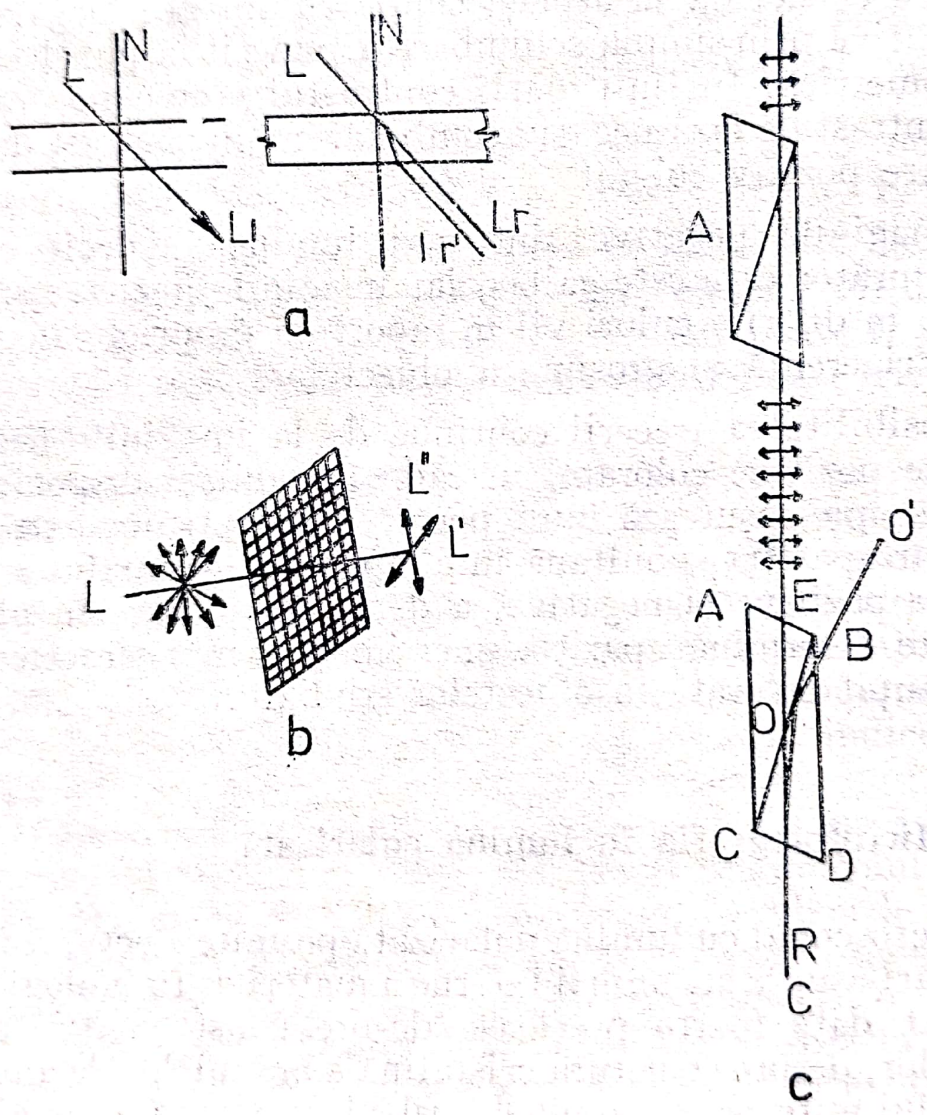


Fig. 33. Schema microscopului polarizant:
a — direcția razelor luminoase într-o substanță; *b* — acțiunea unei raze incidente asupra unui corp birefrigent; *c* — polarizarea luminii prin prisma Nicol.

Scanned with OKEN Scanner

O primă prismă Nicol sau filtru polarizator este plasată între sursa luminoasă și obiectul care se studiază; acesta este plasat pe o platină turnantă care permite rotirea ei și odată cu ea și a lamei port-obiect.

Al doilea polarizator, destinat să analizeze lumina după trecerea prin obiect, este așezat între obiectiv și ocular. Acesta se numește prismă analizator sau analizor (Nicol). Nicolii se obțin prin tăierea unui spat de Islanda, perpendicular pe direcția razei incidente, relipind la loc suprafețele cu balsam de Canada. Nicolii pot fi: încrucișați, cînd sînt așezați în lungul aceleiași axe optice, avînd secțiunile principale în două plane perpendiculare și paraleli, cînd sînt așezați în lungul aceleiași axe optice, avînd secțiunile principale în același plan.

La majoritatea microscoapelor polarizante moderne, Nicolii sînt înlocuiți cu plăci din mase plastice conținînd compuși organici cu proprietăți optice speciale. Aceste plăci se numesc „polaroizi" și se comportă la fel ca polarizatoarele.

Principiul de funcționare al microscopului polarizant este următorul:

Razele luminoase nepolarizate pătrund în prisma Nicol, prin una dintre fețele sale; ele sînt descompuse în două raze care vibrează în unghi drept una în raport cu cealaltă; raza ordinală, care se supune legilor refracției și suferă o reflexie totală, și raza extraordinală, care este transmisă cu altă viteză și ale cărei vibrații se stabilesc în planul figurii.

Lumina transmisă prin prisma Nicol este deci polarizată într-un singur plan. Dacă un al doilea Nicol este plasat în serie cu primul și într-o poziție identică cu primul, lumina polarizată este transmisă. Prin rotirea analizatorului cu 90°, Nicolii devin încrucișați, cîmpul vizual devine întunecat. În această situație, dacă între cei doi Nicoli se interpune un corp birefrigent (cristalizat), el devine strălucitor, ceea ce indică că a fost polarizat de lumina care-l traversează. Dacă se rotește încă odată analizatorul cu 90°, cîmpul devine obscur. Unghiul de rotație al celei de a două prisme, necesar pentru a restabili obscuritatea, măsoară deviația planului de polarizare a luminii prin obiectul interpus.

Scanned with OKEN Scanner

Rotind analizatorul cu 360°, se trece de două ori printr-o poziție în care planurile de polarizare ale celor doi Nicoli sînt paralele (maximum de claritate) și de două ori în cruce, în unghi drept (obscuritate absolută). Dacă Nicolii sînt încrucișați, formînd un unghi oarecare, cantitatea de lumină care trece prin analizator este cu atît mai mare cu cît unghiul este mai mic.

Dacă un obiect transparent este examinat între Nicolii încrucișați, cîmpul poate rămîne obscur sau se poate lumina mai mult sau mai puțin. În cazul în care cîmpul rămîne obscur, în tot timpul unei rotații complete a platinei, corpul poate fi considerat ca monorefringent sau izotrop.

Rotind obiectul în același plan, cîmpul se întunecă și se luminează de patru ori, se poate trage concluzia că obiectul deviază planul de polarizare al luminii și că este birefrigent sau anizotrop.

Obiectul examinat a modificat raza extraordinală ieșită din polarizator și a împărțit-o în două raze dintre care una provoacă în analizator o rază extraordinală care stabilește iluminarea.

Pentru microfotografierea cu dispozitive la care se adaptează aparate fotografice de format mic, cel mai rentabil este aparatul cu analizator tubular.

Aparatele cu oglindă, tip Exacta Varex, fixare cu ajutorul unor tuburi intermediare, permit fotografii exacte în unele cazuri în care razele luminoase, uneori destul de slabe, nu sînt absorbite de geamul mat. Oglinda argintată pe suprafață nu acționează, în acest caz, asupra fenomenelor de polarizare, astfel încît formatul dreptunghiular al camerei poate sta în orice poziție față de direcția de vibrație a analizatorului.

La tubul universal Miflex, trebuie să se verifice existența efectului de polarizare, în cazul în care în prospect nu se găsesc indicații. Tubul se mișcă circular față de direcția de vibrație a analizatorului. Dacă în acest caz fenomenele de polarizare se schimbă, eroarea cauzată de reflexie trebuie înlăturată în modul următor:

Scanned with OKEN Scanner

Între Nicolii încrucișați în poziția de execuție se plasează un obiect cu pozițiile de execuție exact cunoscute (obiect „etalon").

Se îndepărtează analizatorul și se rotește camera față de polarizor pînă cînd apare obscuritatea.

Planul de vibrație al analizatorului, introdus din nou, este acum paralel cu orizontala de pe suprafața reflectată.

Numai pentru această poziție, imaginea observată în luneta de punere la punct este în concordanță cu situația reală.

Pentru microfotografierea în lumină polarizată, obiectivele apocromatice dau cele mai bune rezultate, din cauza bunei lor corecții cromatice. Prin măsurarea exactă a mărimilor caracteristice fenomenelor de polarizare, vom utiliza obiective acromatice.

Obiectivele apocromatice și semiapocromatice au elemente optice alcătuite din spatfluor, care prezintă birefringență. Datorită gamei de culori destul de întinse care se obține în cazul microscopiei în lumină polarizată, este bine să folosim material fotografic ortopancromatic (v. tabelele 26—27), dacă nu preferăm să diminuăm contrastul prin folosirea luminii monocromate. Se recomandă o developare pentru granulație fină. Rezultate foarte bune se obțin folosind lampa cu impulsuri de lumină.

Rocile și minereurile se studiază în lumină polarizată, prin iluminarea incidentă, după ce s-a șlefuit foarte fin suprafața de cercetat.

Examinarea metalografică în lumina obișnuită, după pregătirea suprafeței obișnuite a metalului de studiat, poate fi completată și prin studierea în lumină polarizată.

Cînd se fotografiază suprafețe șlefuite folosind dispozitivul Miflex, sau tuburile intermediare nu se vor obține întotdeauna rezultate bune. Se va prefera utilizarea camerelor fotografice verticale cu burduf (tip Zeiss-Standard).

La cercetarea preparatelor biologice trebuie să se acorde multă atenție modului de pregătire al acestora.

Deparafinarea preparatelor trebuie să fie foarte îngrijită.

Scanned with OKEN Scanner

Rămînerea unor urme de parafină la nivelul membranelor nucleare și hematiilor conduce la fenomene de birefringență supărătoare.

La nucleoproteine, indicele de refracție pentru vibrațiile paralele cu lungimea axului este mai mic decît acela pentru vibrațiile perpendiculare. În acest caz avem de a face cu o birefringență negativă.

Cînd se studiază un preparat biologic, semnul negativ sau pozitiv al birefringenței se poate determina cu o lamă de gips care se plasează într-o fantă, în corpul microscopului analizator. Această lamă este un obiect birefringent care dă așa-numitul „roșu de prim ordin", efect datorat întîrzierii cunoscute a razelor luminoase, pe care o provoacă această lamă.

Cînd Nicolii sînt încrucișați, placa de „roșu de prim ordin" dă un „cîmp roșu" pentru că provoacă o întîrziere de o lungime de undă pentru o lumină $\lambda = 551$ m μ (galbenă —verde). De pildă, dacă un prepatat cu birefrigență pozitivă (de exemplu fibre musculare) este așezat pe platina microscopului și orientat la 45° în raport cu planele de polarizare, fibra apare albastră în cîmp roșu. Dacă fibra este orientată la 90° față de această poziție, ea va apărea galbenă sau portocalie. Semnul birefringenței poate fi deci dedus din culoarea obiectului, atunci cînd se folosește placa de gips care dă „roșul de prim ordin".

Cînd se trece la microfotografiere, trebuie să se țină seama de toate impuritățile și defectele dispozitivului microscopic, situate în apropierea diafragmei cîmpului vizual și a cîmpului de iluminare, care dau erori nedorite și imagini false.

De aceea, trebuie să verificăm curățenia ocularului și a filtrelor. Curățirea ocularului o putem verifica prin rotirea lui în jurul axei. Deplasarea punctelor și impurităților, odată cu rotirea, ne indică existența urmelor de praf.

Cînd folosim lumina polarizată, vom avea grijă ca polarizatorul să fie intercalat între geamul mat și lentilele condensorului. În caz de inversare, geamul mat produce depolarizarea luminii.

Scanned with OKEN Scanner

4.7. Microfotografia în lumină fluorescentă

Microscopia fluorescentă ocupă un loc important în studiile de microbiologie și citohistologie. Ea se bazează pe proprietatea pe care o au o serie de substanțe de a deveni luminoase (luminiscente) în cazul în care sînt traversate de un flux de raze invizibile, cu lungimea de undă scurtă (violete, ultraviolete, röentgen etc.).

În anul 1929, C. Zeiss a construit împreună cu Ellinger un microscop cu fluorescență intravital, care servea la observarea proceselor fiziologice la animalele de experiență vii. În organele ce trebuiau observate se injectau lichide fluorescente. Aceste metode au fost folosite și la colorarea preparatelor histologice pentru studiul în ultraviolet.

În anul 1931, Heissinger, introduce termenul de fluorocromizare, adică de impregnare a preparatelor cu produse fluorescente.

Dintre fluorocromii mai des utilizați, menționăm: acridina-galbenă, acridina—oranj, auramina, triptoflavin, rhodamina 3 C, galben de tiazol G, sulfat de berberină, primulină, fluoresceină, uranină, fuxină acidă etc.

Aceste substanțe se aplică în soluții foarte puternice (pînă la 10^{-4}) și trebuie păstrate în sticle brune la întuneric. Cei mai buni fluorocromi s-au dovedit a fi substanțele naturale ca: clorofila, berberina, chinina etc.

Ca și ceilalți coloranți fluorocromici, se fixează selectiv pe diverse structuri celulare față de care au afinitate. Astfel, galbenul de tiazol G colorează citoplasma, iar sulfatul de berberină nucleii. Acești coloranți, sub acțiunea radiațiilor ultraviolete, devin fluorescenți, evidențiind structurile pe care le fixează. Ca exemplu putem da lignina, care în prezența oranjului de acridin, manifestă o fluorescență secundară, roșie. Se observă imagini policrome deoarece diferite celule ale unui țesut sau constituenții aceleiași celule se comportă selectiv față de fluorocrom, ceea ce permite studiul lor (I. Anghel, N. Toma, Z. P. Pauşeva).

Prin urmare, preparatele la microscopul cu fluorescență apar luminiscente pe un fond întunecat. Montarea preparatelor trebuie făcută în medii nefluorescente cum sînt:

Scanned with OKEN Scanner

glicerina, uleiul de parafină, metacrilatul de izobutil, alcooli polivinilici sau soluție fiziologică.

Microscopia prin fluorescență se folosește în paleontologie, petrografie, mineralogie, chimie, criminalistică și mai ales în microbiologice, unde se utilizează două procedee interesante și anume: anticorpii fluorescenți și fluorescența bicromă.

Tehnica anticorpilor fluorescenți a fost introdusă în știință de Coons (1950) și constă în fixarea de către antigenul existent în diferitele componente celulare a anticorpilor omologi conjugați cu o substanță care este fluorescentă în lumina ultravioletă.

Florescența bicromă se folosește în tratarea celulelor cu substanțe fluorescente, care au capacitatea de a transforma lumina razelor ultraviolete în fluorescență bicromă, în funcție de substratul chimic din celulă.

Fluorocromul cel mai des folosit este colorantul acridin oranj, care evidențiază acidul ribonucleic din citoplasmă și din nucleol prin lumina fluorescentă de culoare roz — cărămizie, iar acidul dezoxiribonucleic din nucleu prin lumina flourescentă galbenă-verzuie.

Pentru a putea efectua cercetări și executa microfotografii în lumină ultravioletă, vom avea nevoie de:

— o sursă de lumină puternică;
— filtre de separare;
— un microscop cu sistem optic bine ales;
— cunoașterea tehnicii preparării materialelor care se studiază în ultraviolet, aplicînd coloranții specifici în domenul de cercetare respectiv;
— un dispozitiv de microfotografiere echipat cu filme sau plăci, avînd emulsia cea mai potrivită pentru fotografierea în ultraviolet.

Sursa de lumină

Ca sursă de lumină poate fi folosită o lampă de cuarț cu vapori de mercur sau o lampă cu arc voltaic.

Radiațiile cele mai potrivite pentru producerea fluorescenței se găsesc la extremitatea spectrului vizibil, în albastrul extrem și la începutul spectrului invizibil, în ultra-

Scanned with OKEN Scanner

violet apropiat. Este necesar să alegem o sursă de lumină extrem de puternică, întrucît filtrele folosite absorb lumina, iar radiațiile ce străbat pînă la preparat trebuie să fie suficient de puternice, pentru a produce fluorescența.

Un dispozitiv practic pentru studiul și microfotografierea în ultraviolet este dispozitivul cu fluorescență produs de întreprinderea Carl Zeiss Jena (fig. 34).

Întregul aparat are ca suport un banc de șină, pe care sînt instalate sursele de lumină cu dispozitive anexe și locul unde poate fi fixat microscopul. Lumina este dată de un arc voltaic format între doi cărbuni ce sînt menținuți la o distanță constantă în timpul funcționării, pentru a da lumină constantă, lucru realizat prin dispozitivul de orologerie ce acționează cu cei doi cărbuni.

Urmează apoi un colector, diafragma cîmpului luminos, o cuvă și filtrele de lumină. Cuva este umplută cu o soluție de 1,3% sulfat de cupru, soluție care joacă rol de filtru. Soluția oprește trecerea radiațiilor roșii și infraroșii, împiedicînd o supraîncălzire a filtrelor sensibile la căldură precum și o eventuală alterare a preparatului. Concentrația va fi cea mai potrivită în cazul în care obiectul va apărea pe un fond cît mai întunecat. Soluția de sulfat de cupru

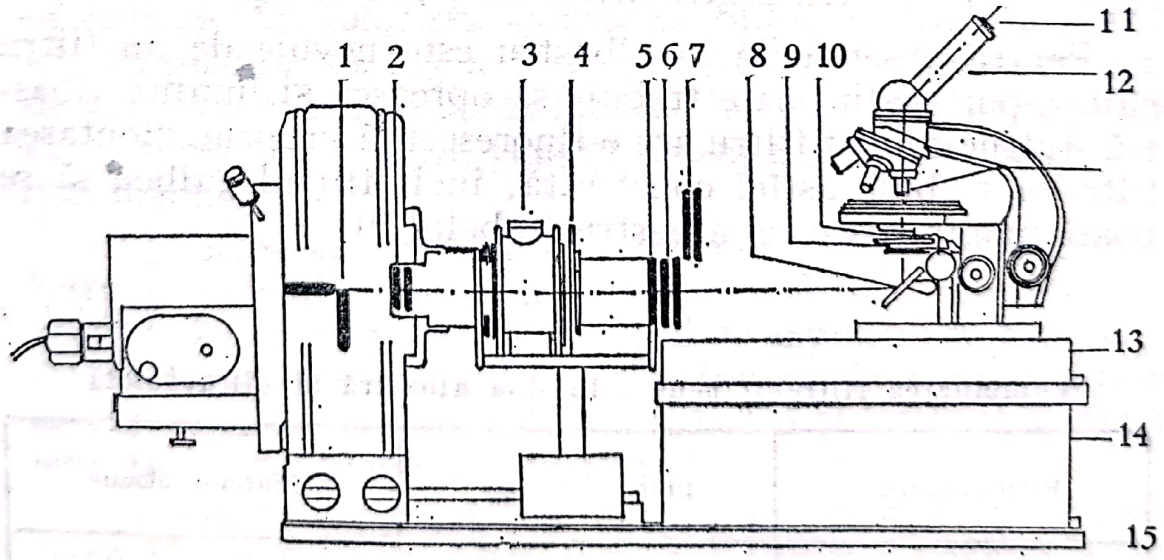


Fig. 34. Aparatul de luminiscență C. Zeiss Jena:

1 — arc de cărbune de 10 A sau 6 A; *2* — partea posterioară a colectorului; *3* — cuvă pentru soluția de sulfat de cupru; *4* — diafragma cîmpului de lumină; *5* — partea anterioară a colectorului; *6* — filtru albastru; *7* — filtru ultraviolet; *8* — oglinda microscopului; *9* — sticlă de uran pentru centrarea luminii; *10* — condensori; *11* — ocular; *12* — tub ocular; *13* — filtru de blocare a ocularului; *14* — placa de lemn; *15* — suportul de lemn.

Scanned with OKEN Scanner

trebuie din cînd în cînd împrospătată. Filtrele de selecție a razelor sînt constituite din două filtre transparente pentru ultraviolet (Schott U.G.1) de 3,5 și 1,5 mm și două filtre albastre (Schott B.G.3) și 4 și 2 mm grosime.

Pentru studiul în ultraviolet poate fi folosit orice microscop. Nu este necesar ca microscopul să aibă sistemul optic din cuarț, pentru că lumina fluorescentă ce ia naștere în preparat aparține spectrului vizibil.

Se întîmplă însă că de multe ori sticla din care sînt făcute lentilele obiectivelor apocromatice prezintă o fluorescență proprie, astfel încît imaginea obținută este denaturată.

Folosirea lamelelor construite dintr-o sticlă ce oprește razele ultraviolete îndepărtează acest fenomen supărător.

În afară de filtre de lumină, mai sînt folosite filtre de blocare, care sînt așezate pe ocular. Aceste filtre împiedică trecerea luminii ultraviolete sau albastre care a pătruns prin preparat și nu s-a transformat în lumină de fluorescență, putînd stînjeni observarea.

Pentru observările în ultraviolet se folosește, ca filtru de blocare, o sticlă galben-deschisă, care oprește complet razele ultraviolete, fiind însă transparentă mai ales pentru regiunea de spectru dintre ultraviolet și albastru.

Pentru observările în albastru este nevoie de un filtru galben-portocaliu, care trebuie să oprească și lumina albastră. Întrucît acest filtru are o fluorescență proprie, montarea filtrelor trebuie astfel construită, încît filtrul galben să se poată monta peste cel albastru (tabelul 9).

Tabelul 9

Combinarea filtrelor pentru lumina albastră și ultravioletă

Felul excitației	Filtrul de lumină	Filtrul de blocare
Lumină albastră	B.G.3	O.G. 1 sau G.G.9 + O.G. 1
Raze ultraviolete	U.G.1 sau U.G.2	G.G. 9

Scanned with OKEN Scanner

Preparatele vor fi așezate pe o lamă de sticlă obișnuită, care se va verifica înainte, pentru a se stabili dacă nu prezintă o fluorescență proprie. Nu se va folosi un mediu de montare fluorescent. Pentru efectuarea lucrărilor în ultraviolet nu este indicată folosirea balsamului de Canada și a uleiului de cedru. Se pot utiliza glicerina, acetatul de potasiu siropos, uleiul de parafină, salicilatul de metil etc.

Ca mediu de montare, Heissinger propune următoarea rețetă:

Gumă arabică albă	10 g
Glicerină	5 cm^3
Clorat hidrat	7 g
Apă distilată	10 cm^3

Se pot efectua montări definitiv în metacrilat izobutilic sau în alcooli polivinilici.

Fixatorii preparatului nu vor avea săruri de metale grele care inhibă sau micșorează fenomenele de fluorescență.

Parafina are o fluorescență proprie, deci secțiunile în parafină vor fi bine deparafinate.

Dispozitivele pentru microfotografiere

Cele mai bune rezultate se obțin cu ajutorul tubului Miflex, întrucît acesta oferă posibilități comode și precise de reglare. La folosirea camerelor Standard verticale, utilizarea plăcilor de 6,5 × 9 cm necesită un timp de expunere de 6,5 ori mai mare, iar la Miflex, în cazul folosirii plăcilor de aceleași dimensiuni, timpul de expunere va fi de trei ori mai mare.

Expunerea se efectuează în încăperi complet întunecate, întrucît celelalte surse de lumină existente în încăpere generează lumină parazită. Timpul de expunere se determină tot prin expuneri succesive, pornind de la timpul minim de expunere în fotografia la lumină albă și factorul de expunere (în cazul plăcilor fotografice).

Compoziția cromatică a imaginilor obținute prin fluorescență nu permite decît folosirea filmelor pancromatice, iar intensitatea scăzută a luminii rezultate necesită filme cu sensibilitate ridicată. Filmele cu sensibilitate ridicată au însă o granulație mare, lucru nepermis în microfotogra-

Scanned with OKEN Scanner

fiere. Rezultate optime se obțin cu Isopan FF, Isopan F și Superpan, developînd în soluție Rodinal Agfa cu concentrația 1 : 40, timp de 8,10 și respectiv 12 min.

În literatura de specialitate se indică o metodă practică de sensibilizare a plăcilor fotografice pînă la 0,1 μ. Plăcile se introduc cîteva minute într-o baie cu dihidrocholidină. Emulsia se acoperă cu un strat de microcristale, care sub acțiunea razelor ultraviolete devin puternic fluorescente, impresionînd astfel emulsia. Înainte de developare, placa este trecută printr-o baie de acetonă care îndepărtează microcristalele.

În cazul fotografierii obiectelor slab luminate și mobile, vom folosi metoda subexpunerii și a developării îndelungate.

La o expunere de 3—4 ori mai scurtă, corespunde o developare de 2 ore în soluție Rodinal Agfa, 1 : 40, la temperatura de 18°C.

4.8. Microfotografia în infraroșu

Razele vizibile ale luminii sînt cuprinse între 400 și 760 mμ, iar radiațiile infraroșii invizibile pentru ochiul uman se întind de la 760 la 3 000 m .

În cercetările de microscopie interesează radiațiile infraroșii din jurul a 1 000 mμ; între 1 000 și 2 000 mμ se găsesc radiațiile infraroșii de uscare, utilizate în industrie.

Radiațiile infraroșii, invizibile pentru ochiul uman, nu și-au găsit aplicații practice decît în momentul în care Vogel a descoperit principiile sensibilizării plăcilor fotografice la radiațiile infraroșii, cu ajutorul coloranților.

În anul 1874, Becquerel folosea clorofila pentru sensibilizarea plăcilor fotografice în infraroșu.

La începutul secolului XX s-au descoperit criptocianinele, iar ulterior neocianinele, tricarbocianinele etc. care au permis înregistrarea radiațiilor infraroșii pînă aproape de 1 300 m μ.

S-a folosit cu succes microfotografia în infraroșu în următoarele cazuri:

Scanned with OKEN Scanner

— examinarea prin reflexie a suprafețelor ce reflectă radiațiile infraroșii;

— examinarea corpurilor opace pentru lumina vizibilă și transparente pentru radiațiile infraroșii;

— examinarea în lumină infraroșie polarizată a dicroismului sau a birefringenței unor substanțe opace în lumină vizibilă;

— examinarea prin contrast de fază a multor detalii interne ale obiectelor opace în lumină vizibilă, însă transparente pentru radiații infraroșii.

În cercetările metalografice, radiațiile infraroșii dau bune rezultate la studiul capacității de reflexie a diferitelor structuri metalice.

În biologie, examenul țesuturilor vegetale și animale, opace pentru lumina vizibilă, în lumina infraroșie dă rezultate bune. De exemplu, prin examinarea țesuturilor vegetale în infraroșu, se pot descoperi diferite boli criptogamice. Chitina insectelor fiind perfect transparentă prin microfotografiere în infraroșu, se pot observa aspectele fiziologice ale organelor interne, la insectele vii.

Ca sursă de radiații infraroșii se poate folosi orice lampă cu incandescență, fără nici o modificare, deoarece ea produce o cantitate suficientă de radiații, chiar mai mare decît radiațiile vizibile. Lămpile cu arc, lămpile cu vapori de mercur, tuburile cu descărcări în gaze și lămpile cu filament dau rezultate bune.

În microfotografie însă, lămpile cu filament din tungsten dau rezultate dintre cele mai bune.

În ceea ce privește sistemul optic al microscopului, obiectivele apocromatice permit efectuarea deplasării la maximum a corecției obiectivului către lungimi mari de undă.

Orice microscop, dotat cu filtru de selecție pentru raze infraroșii cu plăci speciale, poate fi folosit fără altă modificare pentru fotografierea în infraroșu.

Condițiile de lucru, materialul fotografic și prelucrarea materialului sînt însă diferite de fotografia normală.

Materiale fotografice cu emulsia sensibilizată în infraroșu sînt plăcile și filmele Agfa (tabelul 10).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 10

Caracteristicile plăcilor și filmelor Agfa

Denumirea materialului	Domeniul de sensibilizare, m μ	Sensibilizarea maximă, m μ
Infrarot 700 Hart	600—740	720
Infrarot 750 Hart	690—770	750
Infrarot 800 Hart	750—880	840
Infrarot 850 Hart	790—880	860
Infrarot 700 Rapid	640—760	710
Infrarot 750 Rapid	730—790	770
Infrarot 800 Rapid	740—850	820
Infrarot 850 Fapid	750—870	850
Infrarot 950 Rapid	—	950
Infrarot 1050 Rapid	—	1 050
Film Agfa Infrarapid 750 de 35 mm	—	760

Ca putere de rezoluție, plăcile „Hart" și filmul au posibilitatea de a separa 60—65 linii pe milimetru. Plăcile „Rapid" au o putere de rezoluție de 40 — 45 linii pe milimetru.

Materialele sensibile la raze infraroșii se vor păstra în frigider (cînd sensibilitatea este mai mică de 900 mμ) sau în zăpadă carbonică (cînd sensibilitatea este mai mare de 900 mμ).

Noile materiale produse de firma Agfa sînt mai puțin pretențioase la păstrare. Astfel, plăcile „Hart" și filmul pot fi conservate timp de 6 luni. La plăcile Infrarot Rapid 850, durata de conservare este de 5 luni. La plăcile 1 050 limita de conservare este de 15 luni. Acestea din urmă se vor păstra la 0°C, iar primele tipuri se pot păstra la maximum 19°C, umiditatea relativă în frigorifer trebuind să fie de 50—60%.

Încărcarea casetelor se va face în mod normal, iar la expunere se va face întuneric deplin în încăpere.

La preparat și în obiectiv nu va pătrunde decît lumina filtrată. Lumina dată de sursa luminoasă va trebui astfel triată de către filtre, încît la preparat să nu ajungă decît radiațiile a căror lungime de undă ne interesează. Filtrele care trebuie intercalate între sursa luminoasă și preparat, produse de firmele Agfa și Jena, sînt date în tabelele 11 și 12.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 11

Filtre AGFA

Indicativ	Culoarea	Transparența pentru raze infraroșii, mμ
42	roșu	600
80	roșu deschis	580
81	roșu	600
82	roșu închis	630
83	negru	710
84	negru	730
85	negru	820
587	negru	830
589	negru	870

Tabelul 12

Filtre Jena

Indicativ	Culoarea	Transparențe pentru raze infraroșii, m μ
RG 1	roșu deschis	600
RG 2	roșu	610
RG 5	roșu închis	660
RG 7	roșu intens	850
RG 8	roșu foarte închis	680
RG 9	roșu intens	720
RG 10	roșu intens	750
UG 8	roșu intens	900

Nu se pot utiliza filtrele în mod întîmplător. Ele se vor alege în funcție de sensibilitatea emulsiei plăcii pe care o folosim. De exemplu, plăcile Agfa pentru 800 mμ au o sensibilitate variind între 700—855 mμ. Razele sub 700 mμ trebuie oprite. Vom folosi, de exemplu, filtrul Agfa 85. Dacă vom folosi un filtru absorbant al radiațiilor pînă la 870 mμ (de exemplu Agfa 589), oricît am prelungi expunerea, emulsia nu va fi impresionată, întrucît nu este sensibilă la radiațiile a căror lungime de undă este filtrată de acest filtru. Este bine ca fotografierea să se facă tot sub formă

Scanned with OKEN Scanner

de expunere succesivă. Timpul de expunere va fi însă foarte lung, în raport cu filtrele folosite.

Vom prezenta în continuare (tabelele 13, 14, 15, 16) timpul de expunere în funcție de sensibilitatea emulsiilor și de filtrele utilizate, considerînd cifra ca o valoare medie pentru timpul de expunere în cazul respectiv. Timpul de expunere este calculat pentru cazul folosirii unei lămpi nitrafot. Cifrele sînt exprimate în secunde (tabelele 13 și 14).

Tabelul 13

Plăci rapid

Sensibilitatea, mμ / Indicativul filtrului	Plăci 700	Plăci 750	Plăci 800	Plăci 850	Film 750
	Timpul de expunere, s				
Agfa-42	10	20	20	50	4
Agfa-80	10	20	20	50	4
Agfa-81	10	20	20	50	4
Agfa-82	10	20	20	50	4
Agfa-83	—	30	30	50	10
Agfa-84	—	30	20	40	10
Agfa-85	—	—	—	200	—
Schott RG 1	8	12	12	30	4
Schott RG 2	8	12	12	30	4
Schott RG 5	8	12	12	30	4
Schott RG 8	8	12	12	30	4
Schott RG 9	—	12	12	30	8
Schott RG 10	—	—	20	50	16

În laboratorul de developare, lumina în care se developează materialul fotografic sensibil la radiații infraroșii trebuie de asemenea să îndeplinească condiții speciale.

În cazul prelucrării filmelor și plăcilor cu emulsie sensibilă la lumină infraroșie, developarea se face tot în revelatori speciali.

Din punct de vedere al timpului de developare și al contrastului obținut, putem să clasificăm revelatorii conform tabelului 16.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 14

Plăci Hart

Sensibilitatea, mμ / Indicativul filtrului	Plăci 700	Plăci 750	Plăci 800	Plăci 850
	Timpul de expunere, s			
Agfa-42	10	20	20	50
Agfa-80	10	20	20	50
Agfa-81	10	20	20	50
Agfa-82	10	20	20	50
Agfa-83	—	20	20	50
Agfa-84	—	20	20	50
Agfa-85	—	—	—	200
Schott RG 1	12	16	16	40
Schott RG 2	12	16	16	40
Schott RG 3	12	16	16	40
Schott RG 5	12	16	16	40
Schott RG 8	12	16	16	40
Schott RG 9	—	16	16	40
Schott TG 10	—	—	24	60

Tabelul 15

Tipul de iluminare folosit la developarea materialului fotografic sensibil la radiații infraroșii

Material	Film protecție Agfa	Puterea lămpii și distanța	Iluminarea
Plăci 700—750	108 verde închis	15 w 75 cm	directă
Plăci 800 Film infrarapid 750	108 verde închis	15 w 75 cm	indirectă
Plăci 850—950 Plăci 1050	114 verde deschis	lampă foarte slabă 75 cm	directă

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 16

Tipuri de revelatori

Developanți	Timp de developare, min	Contrast
Agfa Metol hidrochinonă soluție 1:5	4—5	puternic
Agfa 1	4—5	puternic
Agfa final	8—10	normal
Agfa Rodinal 1:20	5—6	normal
Agfa Rodinal: 1 40	9—10	slab
Agfa Atomal F	8—10	slab
Agfa 12	12—15	slab
Agfa 14	15—18	slab
Agfa 15	8—10	slab

Rețetele date în tabelul 16 sînt următoarele:

Agfa 1

Apă . . . . . .700 cm³
Metol . . . . . 5 g
Sulfit de sodiu anhidru . . . . . 40 gr (80 g cristalizat)
Hidrochinonă . . . . . 6 g
Carbonat de potasiu . . . . . 40 g
Bromură de potasiu . . . . . 2 g

Agfa 8

Se recomandă la developarea plăcilor 950 și 1 050

Apă . . . . . .750 cm³
Sulfit de sodiu anhidru . . . . . .12,5 g (25 g cristalizat)
Glicină . . . . . 2 g
Carbonat de potasiu . . . . . 25 g

Se completează cu apă pînă la 1 l.

Scanned with OKEN Scanner

Agfa 12

Apă	750 cm³
Metol	8 g
Sulfit de sodiu anhidru	6 g (12 g cristalizat)
Carbonat de sodiu anhidru	6 g (16,2 g cristalizat)
Bromură de potasiu	2,5 g

Se completează cu apă pînă la 1 l.

Cu ajutorul acestui revelator se obține o granulație foarte fină. Nu poate fi folosit la copiile pozitive.

Agfa 14

Apă	750 cm³
Metol	4,5 g
Sulfit de sodiu anhidru	85 g (170 g cristalizat)
Carbonat de sodiu anhidru	1 g (2,7 g cristalizat)
Bromură de potasiu	0,5 g

Se completează cu apă pînă la 1 l.

Agfa 15

Apă	750 cm
Metol	8 g
Sulfit de sodiu anhidru	125 g (250 g cristalizat)
Carbonat de sodiu anhidru	12 g (32,4 g cristalizat)
Bromură de potasiu	1,5 g

Se completează cu apă pînă la 1 l.

Operațiile de fixare, spălare și uscare sînt identice cu cele de la fotografia normală.

Scanned with OKEN Scanner

Suprasensibilizarea

Există posibilitatea ca plăcilor fotografice să li se mărească în mod accentuat sensibilitatea. Se cunosc două metode de suprasensibilizare: pe cale umedă și pe cale uscată.

Sensibilizarea pe cale umedă

Se prepară următoarea baie:

Apă distilată	1 000 cm³
Carbonat de sodiu cristalizat	80 g
Soluție de amoniac concentrată	80 g

Se poate dilua 1:40 cu apă distilată de la gheață.

Plăcile se țin 10 min în această baie, la temperatura de 10—12°C, apoi se clătesc de cîteva ori cu alcool metilic. Uscarea se face la un ventilator, timp de 10—15 min. Ventilatorul nu trebuie să producă scîntei în timpul funcționării. Operația se face în întuneric complet. La plăcile cu sensibilitatea de 700—850 mμ se va obține o mărire a sensibilității cu 20—40 unități, iar la plăcile pentru 950—1050 mμ o mărire cu 80 unități. Se recomandă ca această metodă să se folosească pentru plăcile expirate. (I. Goldhaar).

Suprasensibilizarea uscată

Aceasta este o metodă mai comodă.

Într-un exicator se introduce o sticlă de ceas cu cîteva picături de mercur. Plăcile împachetate în hîrtie neagră se introduc astfel încît vaporii de mercur să acționeze în mod omogen pe întreaga suprafață a emulsiei. Exicatorul se acoperă în mod etanș cu capacul său.

Vaporii de mercur trec prin porozitățile hîrtiei, acționînd asupra emulsiei. Pachetele cu plăci se țin în exicator circa 2—3 zile, la temperatura camerei.

Suprasensibilizarea are aceeași valoare ca și cea realizată pe cale umedă.

Scanned with OKEN Scanner

4.9. Microfotografia în cazul luminii incidente

Iluminarea incidentă se folosește în microscopie în cazul cercetării obiectivelor opace, cu suprafețe netede, omogene.

Cu ajutorul acestui sistem se studiază suprafețele combustibililor solizi, se cercetează structura microcristalină a aliajelor și metalelor.

Studiul se efectuează cu ajutorul unor microscoape de o construcție specială, ca de exemplu microscopul Zeiss Lug sau Epignost (fig. 35).

Tot din aceeași categorie fac parte microscoapele metalografice Leitz, Zeiss și Reichert, care sînt prevăzute cu camere fotografice cu plăci avînd formatul 9 × 12 sau 13 × × 18 cm.

Majoritatea acestor microscoape nu au nevoie de un grosisment mare (de exemplu microscoapele metalografice), în schimb au nevoie de un cîmp mare.

În aproape toate cercetările microscopice de acest fel, obiectele de cercetat nu vor fi acoperite cu lamelă.

Expunerea și prelucrarea fotografiilor se efectuează conform regulilor de la fotografia prin transparență.

Efecte plastice foarte utile se obțin în cazul microfotografierii combinate cu iluminare prin transparență și prin incidență.

Acest gen de iluminare combinată este folosit la studiul obiectelor constituite din particule în parte opace, în parte transparente pentru lumină, ca de exemplu fibre textile, pulberi, microcristale etc.

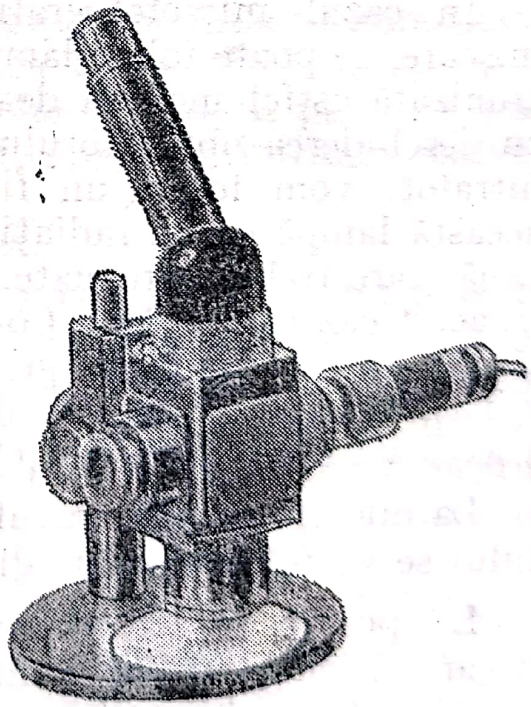


Fig. 35. Microscopul cu lumină incidentă (Epignost).

Scanned with OKEN Scanner

4.10. Microfotografia în culori

Microfotografierea în culori cere o perfectă stăpînire a tehnicii fotografice precum și o bună cunoaștere a opticii microscopului.

O bună fotografiere, care să redea perfect culorile preparatului, necesită un microscop cu sistem optic de cea mai bună calitate.

Atît ocularul cît și obiectivul trebuie să aibă o aberație cromatică cît mai redusă.

O mare importanță o are ecranarea judicioasă. Folosirea unor filtre necorespunzătoare modifică culorile obiectului.

În cele ce urmează vom descrie condițiile de lucru necesare obținerii unor bune microfotografii colorate. Trebuie să știm înainte de toate că microfotografia în culori necesită o iluminare cît se poate de bună, întrucît filmul în culori are o sensibilitate mai redusă. Ca surse de lumină folosim lampa cu arc sau lampa nitrafot.

O sursă bună de lumină este obținută și cu ajutorul unei lămpi de tensiune joasă, cu filament punctiform.

În cazul microfotografierii microorganismelor vii în mișcare, se poate folosi lampa cu impulsuri de lumină, sincronizată astfel încît să dea impulsul luminos concomitent cu deschiderea obturatorului. În cazul luminării cu lampă nitrafot, vom folosi un filtru albastru deschis, întrucît această lampă emite radiații bogate în lumină roșie și galbenă, care trebuie atenuate. Ca peliculă fotografică folosim în acest caz filmul Agfa Color K sau G. În cazul utilizării lămpii cu arc, vom recurge la filmul Agfa Color pentru lumina zilei, notată cu inițiala T sau B. Vom avea grijă de a avea un cîmp iluminat cît mai uniform (I. Goldhaar).

La microfotografia în culori, pentru iluminarea preparatului se va folosi numai oglinda plană a microscopului.

La pozare se va utiliza metoda expunerii succesive: fiecare clișeu va fi expus dublu față de expunerea clișeului anterior. Este bine însă să nu pornim chiar de la timpi de expunere scurți.

Scanned with OKEN Scanner

Cînd avem surse de lumină speciale, putem începe expunerea de la două secunde. Vom expune astfel:

Prima imagine	2 s
A doua imagine	4 s
A treia imagine	8 s
A patra imagine	16 s
A cincea imagine	32 s
A șasea imagine	64 s

În cazul în care nu avem surse speciale de lumină, vom porni de la o expunere superioară.

Se vor alege preparate cu culori deschise, pentru ca fotografia pe material Agfa Color să reușească cît mai bine.

Prezentăm în continuare tipurile de filme care pot fi folosite pentru microfotografiere și care sînt accesibile laboratoarelor din țara noastră:

— Filmul negativ Agfa Color tip B 333, este folosit la expunerile în lumină de arc și la lumina zilei. Sensibilitatea este de circa 17/10 DIN.

— Filmul negativ Agfa Color tip G 334, pentru expuneri la lampa nitrafot sau lămpi speciale de microscop. Sensibilitatea este identică cu a tipului B.

— Filmul reversibil Agfa Color Ultra T este folosit pentru expunerea la lampa cu arc și la lămpile cu impulsuri. Are o sensibilitate echivalentă cu 16/10 DIN.

— Filmul reversibil Agfa Color K, folosit pentru expunerea la lumina becului nitrafot, are o sensibilitate echivalentă cu 13/10 DIN.

— Filmul Agfa Color pozitiv.

Filmele reversibile Agfa Color Ultra T și K sînt folosite pentru obținerea diapozitivelor prin copiere de pe filmul Agfa Color negativ. De pe filmele Agfa Color negative se pot obține și pozitive alb-negru, printr-o copiere directă asemănătoare cu copierea de pe filmele negative alb-negru.

Pentru ca imaginea să apară cu contrast accentuat, se va folosi pentru copiere o hîrtie fără contrast.

Filmele de care dispunem sînt de 35 mm, putînd deci fi folosite la fotografierea în culori cu ajutorul oricărui aparat de format mic (Exacta, Kiev, Leica), care se poate atașa la microscop.

Scanned with OKEN Scanner

Metodele de lucru sînt cele arătate de cercetătorul sovietic I. Iofis și de inginerul român Anton Bielusici, laureat al premiului de stat (tabelele 17, 18 și 21).

Tabelul 17

Principalele operații în prelucrarea filmelor color

Nr. de ordine al operațiilor	Denumirea operațiilor	Durata, min	Temperatura necesară, °C
1	developare în culori	6	18 ± 1
2	spălare	15—20	maxim 15
3	albirea argintului	4—6	maxim 18
4	spălare	5—8	„ 14
5	fixare	5—8	„ 18
6	spălare	15—20	„ 14
7	uscare	60—120	„ 30

Operațiile de prelucrare a filmului negativ

Prezentăm rețetele pentru fiecare etapă, urmînd ca apoi să se facă o descriere amănunțită a modului de lucru.

Pentru developare se recomandă rețetele de soluție revelatoare în culori.

Soluția A

Sulfat de hidroxilamină . . . . . 1,2 g
Sulfat de dietilparafenilendiamin . . . . . 2,75 g

Se completează cu apă distilată pînă la 500 cm³.

Soluția B

Carbonat de potasiu . . . . . 75 g
Sulfat de sodiu anhidru . . . . . 2 g
Bromură de potasiu . . . . . 2,5 g

Se completează cu apă distilată pînă la 500 cm³.

Scanned with OKEN Scanner

În cazul în care nu se poate procura apă distilată, se adaugă la fiecare 500 cm³ de soluție 1 g de etilendiaminotetraacetat de sodiu, pentru îndepărtarea sărurilor apei. De asemenea se poate folosi în acest scop și hexametafosfatul de sodiu (2 g la 500 cm³ soluție). Se va proceda foarte atent la manipularea soluțiilor de sulfat de dietilparafenilendiamină, care dacă atinge tegumentul provoacă o iritare puternică ce se transformă în eczemă. Din această cauză se recomandă în mod insistent folosirea mănușilor de cauciuc, iar în cazul în care soluția revelatoare a atins pielea, porțiunea iritată se va spăla succesiv cu apă, apoi cu o soluție 3% de acid acetic și apoi din nou cu apă.

La prelucrarea soluțiilor se folosesc substanțe pure.

Soluțiile *A* și *B* după preparare, se toarnă într-un vas, agitîndu-se puternic timp de 30—45 min. Se filtrează soluția și se lasă apoi într-un vas deschis timp de 24 ore, pentru maturație.

Soluția se poate păstra timp de cîteva săptămîni și poate fi folosită pentru developarea a 5—6 m de peliculă Agfa Color de 35 mm.

Soluțiile pentru albire

Rețeta I

Fosfat acid de potasiu	4,4 g
Fosfat de sodiu	3,2 g
Fericianură de potasiu	80 g
Apă distilată pînă la	1 000 cm³.

Sărurile se dizolvă în apă caldă (30—35°C) în ordinea arătată, se omogenizează și se filtrează. Se păstrează la întuneric și în borcane de culoare brună.

Rețeta II

Fericianură de potasiu	50 g
Clorură de sodiu	50 g

Rețeta III

Fericianură de potasiu	50 g

Se completează cu apă distilată pînă la 1 000 cm³.

Scanned with OKEN Scanner

Modul de lucru

Pelicula se tratează 6 min în soluția revelatoare la 18°C. Variațiile de temperatură și durata developării au influență puternică asupra densității generale a imaginii fotografice și asupra echilibrului de culori.

În cazul supraexpunerii, timpul de developare poate fi scurtat la 4 min, dar în nici un caz mai puțin.

Variațiile de temperatură cu mai mult de ± 1°C pot duce la o redare necorectă a culorilor.

După developare, urmează prima spălare în apă, prin care se îndepărtează substanțele chimice din straturile de emulsie. Este necesară o spălare energică timp de 15—20 min, întrucît rămînerea pe peliculă a urmelor de substanțe din baia de developare poate duce, ajungînd în soluția băii de înălbire, la o voalare.

Temperatura mai mare de 14°C a apei de spălare poate cauza o voalare puternică, formarea unor bule,topirea gelatinei sau desprinderea straturilor de emulsie.

Cu cît temperatura apei de spălare este mai coborîtă, cu atît este necesară o spălare mai îndelungată. Pentru a se preîntîmpina desprinderea stratului de emulsie se recomandă spălarea negativelor cu apă alcalinizată sau apă de fîntînă, dar în nici un caz nu se va folosi aici apă distilată.

La operația a treia (albirea argintului), durata procesului de înălbire este de minimum 4 min. la temperatura de 18°C. După înălbire, negativul se spală din nou circa 5 min, în general atîta timp cît este necesar pînă cînd apa de spălare nu se mai colorează în gălbui.

După această ultimă spălare, operațiunile următoare se pot face la lumină.

Fixarea negativului se face într-o soluție de 20% hiposulfit de sodiu. Într-un filtru de soluție se fixează 7 m peliculă de 35 mm.

Nu se pot folosi fixatori acizi, deoarece aceștia distrug coloranții care compun imaginea negativă colorată. Durata fixării este de 5—8 min. la 18°C apoi negativul în culori se spală definitiv timp de 15—20 min sub duș sau într-un curent puternic de apă la 16°C.

Scanned with OKEN Scanner

Uscarea se face la maximum 30°C, timp de 1—2 ore. Se va feri pelicula de lumină vie în timpul uscării, iar spațiul în care se face uscarea va fi complet lipsit de praf. Negativele în culori se conservă în cutii din metal cu capacele lipite cu bandă adezivă.

Operațiile de prelucrare a filmului reversibil

Principalele operații de prelucrare a filmului reversibil sînt eșalonate în tabelul 18.

Tabelul 18

Operațiile de prelucrare a filmului reversibil

Nr. crt.	Denumirea operației	Durata operației, min	Temperatura soluției, °C
1	developarea negativă în alb — negru	35	18 ± 1
2	spălare	30	maxim 16
3	iluminare cu lumină albă (reexpunere)	5	—
4	developare în culori	11	18 ± 1
5	spălare	30	maxim 16
6	albirea argintului	5	maxim 18
7	spălare	5	maxim 16
8	fixare	5	maxim 18
9	spălare	20	maxim 16
10	uscare	60 — 120	maxim 30

Soluția de developare alb-negru

Sulfit de sodiu anhidru . . . . . 50 g
Amidol . . . . . 5 g
Bromură de potasiu . . . . . 1 g

Se completează cu apă distilată pînă la 1 000 cm³.

Soluția se prepară cu 1—2 ore înainte de folosire. Soluția revelatoare de culori are aceeași rețetă cu revelatorul arătat în paragraful precedent.

Scanned with OKEN Scanner

Soluția de albire

Fosfat acid de potasiu . . . . . 5,8 g
Fosfat de sodiu . . . . . 4,3 g
Fericianură de potasiu . . . . . 100 g

Se completează cu apă pînă la 1 000 cm³.

Sărurile se dizolvă în puțină apă caldă (30—35°C), apoi, după dizolvarea completă, se adaugă apă rece pînă la volumul necesar. Soluția se omogenizează bine și se filtrează. La întuneric, soluția se poate păstra în bune condiții timp de cîteva săptămîni.

Soluția de fixare rapidă

Tiosulfat de sodiu . . . . . 120 g
Clorură de amoniu . . . . . 80 g

Se completează cu apă pînă la 1 000 cm³.

Soluția de fixare normală

Tiosulfat de sodiu . . . . . 200 g

Se completează cu apă pînă la 1 000 cm³.

Pelicula se tratează cu revelator alb-negru. Timpul de developare este de 35 min. Operația se execută la întuneric complet, temperatura băii neavînd voie să depășească 18°C. Developarea se face prin agitare puternică. Operația secundă, spălarea, se face la maximum 16°C, timp de 30 min, la întuneric complet. Spălarea se face energic.

A treia operație, reexpunerea, se efectuează supunînd pelicula la lumina unei lămpi cu incandescență de 300—500 W, așezată la 50 cm de peliculă, timp de 5 min. Iluminarea trebuie făcută omogen. Developarea în culori se poate efectua la lumină albă difuză, în baie la 18 ± 1°C, timp de 11 min, agitînd soluția puternic. Celelalte operații (spălarea, albirea, spălarea, fixarea, spălarea și uscarea) se efectuează în condițiile arătate la prelucrarea peliculei negative în culori; duratele sînt specificate în tabelul 18 în care sînt prezentate operațiile de prelucrare a filmului reversibil.

Scanned with OKEN Scanner

Menționăm că în tot cursul prelucrării filmului, trebuie să se acorde o atenție deosebită manipulării peliculei, gelatina udă fiind extrem de sensibilă la cea mai mică atingere, deteriorîndu-se cu ușurință.

Copierea negativelor în culori

Copierea negativelor în culori pe hîrtie pozitivă este mult mai complexă decît copierea în alb-negru. O mare importanță o are corectura erorilor de redare a culorilor. Mai ales la fotografiile necesare în lucrările științifice, redarea culorilor trebuie să fie cît mai corectă. În mod normal, negativului trebuie să i se aplice o corecție de culoare la copiere, întrucît apar o serie de abateri de la redarea cît mai naturală a culorilor, fie din cauza unor abateri de la echilibrul ideal al culorilor, la materialele negative și pozitive color, fie din cauza compoziției spectrale variate a luminii folosite în timpul fotografierii, a compoziției spectrale variate a izvoarelor de lumină ale aparatelor de copiere etc. Operația se realizează cu ajutorul unui filtru special colorat, care se așază în calea fasciculului de lumină dat de lampa folosită la copiere. Culorile de bază ale filtrelor sînt: galben, purpuriu și albastru deschis. Trusa de filtre conține cîte 10 filtre din fiecare culoare, filtrele din fiecare garnitură de aceeași culoare deosebindu-se prin densitatea culorii.

Filtrul cu densitate maximă se consideră 100%, fiecăruia scăzîndu-i-se un anumit procent, în raport cu scăderea densității.

O metodă comodă pentru stabilirea unei potriviri perfecte a culorilor este aceea a folosirii filtrelor mozaic (fig. 36).

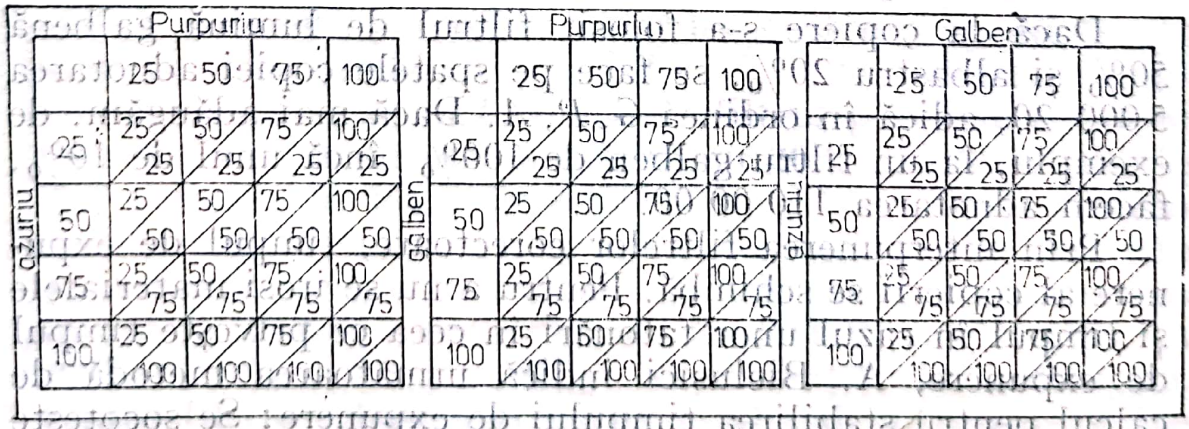


Fig. 36. Filtrul mozaic.

Aceste filtre au dimensiunile de 12 × 12 cm, 6 × 6 cm etc.

În figură se observă trei asemenea filtre mozaic, compus fiecare dintr-o combinație de filtre în două nuanțe de culori diferite, cu un interval de densități de 25%, așezate în ordinea unei table de șah. O asemenea tablă conține următoarele combinații: galben-purpuriu (24), purpuriu-azuriu (25), azuriu cu galben (25), în total 75 de combinații diferite.

La copiere, filtrul mozaic se așază deasupra hîrtiei, astfel încît expunerea să se facă prin el. În urma prelucrării fotografice, se obține o imagine pozitivă împărțită în 25 pătrățele identice cu ale filtrului mozaic. Examinîndu-se apoi acest pozitiv de probă, se poate stabili cu ce combinații de filtre de lumină se va face copierea definitivă a pozitivului.

Întrucît se întîmplă ca tocmai partea principală a subiectului să rămînă în afara condițiilor optime de fotografiere, este necesar a se face probe suplimentare pentru a încadra partea principală a subiectului în sectorul necesar filtrului mozaic.

O metodă bună pentru găsirea celor mai bune combinații ale filtrelor de lumină este aceea a „copierii practice".

În general, trebuie să se știe că orice nuanță dominantă care dă un pozitiv fals din punct de vedere al coloritului se îndepărtează cu filtrul care are aceeași nuanță cu cea nedorită a copiei. Cînd copia colorată are o nuanță prea galbenă, filtrul corector va fi de culoare galbenă. Cu cît mai puternică este dominanta oricărei culori, cu atît filtrul ce se va folosi va fi mai dens. Filtrele de lumină au notația din tabelul 19 pentru a fi manipulate cu mai multă ușurință.

Dacă la copiere s-a folosit filtrul de lumină galbenă 50% și albastru 20%, se face pe spatele copiei adnotarea 5 000 20, adică în ordinea *G*, *P*, *A*. Dacă mai adăugăm, de exemplu, la un filtru galben de 100% încă unul de 10%, facem adnotarea 110 00 00.

Prin interpunerea filtrelor corectoare, timpul de expunere al copierii se schimbă. Pentru a nu se irosi materialele și timpul în cazul unor tatonări în ceea ce privește timpul de expunere, A. Bielusici indică următoarea metodă de calcul pentru stabilirea timpului de expunere: Se socotește drept bază valoarea timpului de expunere determinat pe

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 19

Filtre de lumină

Galben			Purpuriu			Albastru		
05	00	00	00	05	00	00	00	05
10	00	00	00	10	00	00	00	10
20	00	00	00	20	00	00	00	20
30	00	00	00	30	00	00	00	30
40	00	00	00	40	00	00	00	40
50	00	00	00	50	00	00	00	50
60	00	00	00	60	00	00	00	60
70	00	00	00	70	00	00	00	70
80	00	00	00	80	00	00	00	80
90	00	00	00	90	00	00	00	90
100	00	00	00	100	00	00	00	100

cale experimentală cu ajutorul probelor, în condițiile de copiere date (mărirea la aparatul de copiat și tensiunea rețelei), fără a se folosi filtrele de lumină. Se obține așa-numita „probă zero". Cunoscînd timpul de expunere inițial, putem determina prin calcul, timpul de expunere la copiere pentru orice filtre. De pildă, filtrul galben influențează mai puțin mărirea timpului de expunere; folosind filtre galbene cu densități pînă la 20%, nu este necesară mărirea timpului de expunere inițial. La folosirea unui filtru galben cu densitatea de 30—40% va fi necesară o mărire cu circa 5% a timpului de expunere, iar la densitatea de 50% corespunde o mărire cu 10% a timpului de expunere. Dacă timpul inițial de expunere fără filtre de lumină este de 10 s, iar potrivirea culorilor pentru procesul de copiere necesită combinația de filtre 00 30 20, mărirea timpului de expunere se va face astfel: filtrul purpuriu 00 30 00 cere 00 00 20, care cere o mărire cu 20%. Întrucît filtrele sînt montate în plăci de sticlă care și ele absorb radiații în mod suplimentar, fiecare placă de sticlă a filtrului cere o mărire de 10%; fiind două plăci de sticlă, expunerea se va mări cu 20%, deci expunerea inițială se va mări cu 30% + 20% + 20% = 70%. Coeficienții de prelungire, pentru filtrul albastru și purpuriu sînt de 10% pentru fiecare mărire a densității cu 10%.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 20

Valorile timpilor de expunere

Mărirea timpului de expunere, %	Timp de expunere complex s,							
	5	10	15	20	25	30	40	50
10	5,5	11,0	16,5	22,0	27,5	33,0	44,0	55,0
20	6,1	12,1	18,2	24,2	30,3	36,3	48,4	60,5
30	6,7	13,3	20,0	26,6	33,3	39,9	53,2	66,6
40	7,3	14,6	22,0	29,3	36,6	43,9	58,6	73,2
50	8,0	16,1	21,1	32,2	40,2	48,3	64,4	80,5
60	8,8	17,7	26,6	35,4	44,3	53,1	70,9	88,6
70	9,7	19,5	29,2	39,0	48,7	58,5	77,9	97,4
80	10,7	21,4	32,1	42,9	53,5	64,3	85,7	107,2
90	11,8	23,6	35,3	47,1	58,9	70,7	94,3	117,3
100	12,9	25,9	39,8	51,8	64,8	77,8	103,7	129,7
110	14,2	28,5	42,7	57,0	71,2	85,6	114,1	142,6
120	15,6	31,4	47,0	62,7	78,4	94,1	125,5	156,9
130	17,2	34,5	51,7	69,0	86,2	105,5	138,0	172,6
140	18,9	37,9	56,9	7,59	94,8	113,9	151,8	189,8
150	20,8	41,7	62,6	83,5	104,3	125,2	167,0	208,0
160	22,9	45,9	68,8	91,8	114,7	127,8	188,7	229,7
170	25,1	50,5	75,7	104,0	126,2	158,5	202,1	252,6
180	27,7	55,5	83,3	111,0	138,8	166,7	222,3	272,9
190	30,4	61,1	91,6	122,2	152,7	183,3	244,5	305,7
200	33,5	67,2	100,7	134,4	167,9	201,7	268,9	336,2

Scanned with OKEN Scanner

Cunoscîndu-se procentajul ce trebuie adăugat expunerii inițiale în funcție de filtrele ce se folosesc pentru corecție, se pot extrage din tabelul 20 valorile timpilor de expunere folosiți. Tabelul se folosește astfel: unui timp inițial de expunere, de exemplu 10 s, îi corespunde un filtru de lumină corector de 00 80 00. Prelungirea timpului de expunere pentru purpuriu este de 90% plus 10% pentru sticla filtrului. Timpul de expunere se caută în tabel la intersecția rîndului orizontal 100% și a coloanei verticale 106. Timpul corect de expunere va fi de 25,9 s. O altă posibilitate este următoarea: la o expunere inițială de 25 s, se cere corectarea timpului față de filtrul 00 11 060 folosit. Mărirea timpului de expunere total este dată de două filtre purpurii de 100% și 10% și unul albastru de 60%, iar corecția pentru cele trei filtre din sticlă va fi de 30%, deci în total 200%. Timpul de expunere corespunzător va fi de 167,9 s.

Tabelul 21

Operațiile de developare a pozitivului în culori

Nr. de ordine al operațiilor	Denumirea operației	Durata, min	Temperatura soluției, C°
1	Developarea în culori	3	18 ± 1
2	Spălarea I	2	14
3	Încetarea procesului de developare	5	18
4	Spălarea a II-a	5	16
5	Înălbirea	5	18
6	Spălarea a III-a	5	16
7	Fixarea	5	18
8	Spălarea a IV-a	20	14—16
9	Uscarea	120 max.	25—30 max.

Soluții pentru developare în culori

Soluția A

Sulfat de hidroxilamină 2 g

Sulfat de etil oxidilparafenilendiamin 3,5 g

Se completează cu apă distilată pînă la 500 cm³.

Soluția B

Carbonatul de potasiu anhidru . . . . . .75 g
Sulfit de sodiu anhidru . . . . . .0,5 g
Bromură de potasiu . . . . . .0,5 g

Se completează cu apă distilată pînă la 500 cm³. Soluțiile *A* și *B* se amestecă, putînd fi folosite după 24 ore. Se mai pot folosi și revelatori utilizați la developarea negativelor în culori.

Soluția de oprire (baia stop)

Benzosulfonat de sodiu . . . . . .2 g
Fosfat disodic . . . . . .10 g
Fosfat monosodic . . . . . .10 g
Hiposulfit de sodiu . . . . . .200 g

Se completează cu apă distilată pînă la 1 000 cm³.

Soluția de înălbire

Fericianură de potasiu . . . . . .20 g
Fosfat disodic . . . . . .8 g
Fosfat monosodic . . . . . .12 g

Se completează cu apă pînă la 1 000 cm³.

Ca fixativ se folosește o soluție 20% hiposulfit de sodiu. Mai există o rețetă de scurtare și simplificare a developării pozitivelor în culori pe hîrtie.

Operațiile de prelucrare sînt:

Developare în culori . . . . . .3 min, 18°C
Spălare . . . . . .10 min, 16°C
Oprire + albire + fixare . . . . . .6 min, 18°C
Spălare finală . . . . . .20 min, 16°C

Soluția de oprire + înălbire + fixare este următoarea:
Sare de fier trivalent a acidului etilen-diaminotetra acetic . . . . . 80 g

Scanned with OKEN Scanner

Carbonat de potasiu anhidru . . . . . 16 g
Benzosulfonat de sodiu . . . . . 4 g
Bromură de potasiu . . . . . 24 g
Hiposulfit de sodiu . . . . . 120 g

Se completează cu apă pînă la 1 000 cm^3.

Uscarea fotografiilor pozitive în culori (pe hîrtie) trebuie să se facă numai în timp de 2 ore, o uscare mai îndelungată distrugînd redarea corectă a culorilor. La uscare, hîrtia trebuie așezată vertical, pentru a da posibilitatea apei să se scurgă de pe emulsie.

Întrucît acțiunea razelor solare directe și, în general, lumina puternică denaturează culorile, este bine ca pozitivele în culori să fie păstrate în plicuri, cutii sau albume.

Microfotografia științifică în culori prezintă o importanță documentară deosebită.

Ilustrarea cursurilor și conferințelor prin proiectarea diapozitivelor în culori, ilustrarea lucrărilor științifice cu microfotografii colorate pot contribui la înțelegerea mai deplină a fenomenelor într-o serie de probleme științifice.

În cristalografie și metalografie, fotografia pe film Agfa Color dă rezultate bune (planșele VIII, IX, X).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul

V

Microscopul electronic și electronofotografia

Microscopul electronic constituie unul dintre cele mai moderne aparate de cercetare, grație căruia s-au înregistrat progrese extraordinare în descifrarea diferitelor formațiuni biologice, arhitectonicii ultrastructurale și funcționale a celulei*).

Principiul de funcționare se bazează pe descoperirea de către L. de Broglie (1924) a caracterului ondulatoriu al unor particule elementare în mișcare, așa cum sînt de exemplu electronii: ca urmare ele pot da naștere la fenomene de difracție și de interferență asemănătoare cu cele semnalate pentru lumină. Ulterior Busch (1926) arată că fascicolul de electroni se comportă într-un cîmp electric sau magnetic la fel ca și razele luminoase, adică electronii sînt deviați în calea lor într-un mod comparabil cu devierea luminii în momentul traversării unui mediu transparent cu indice de refracție mai mare.

Pe baza acestor date, Knoll și Ruska (1931) au demonstrat pentru prima dată posibilitatea obținerii unei imagini cu ajutorul unui fascicol de electroni care traversează un cîmp electric sau magnetic, cîmpuri care funcționează ca un sistem de lentile (I. Angel, N. Toma).

*) Deoarece în literatura științifică de specialitate au apărut unele lucrări moderne de electronomicroscopie citate la bibliografie (5, 17, 18), în acest capitol prezentăm în general microscopul electronic, modul lui de organizare și funcționare.

Scanned with OKEN Scanner

Primul microscop electronic a fost construit în anul 1934 de către Ruska, la Berlin, iar de atunci și pînă în prezent s-au elaborat numeroase tipuri de microscoape electronice, din ce în ce mai complexe și mai perfecționate.

Cele mai bune tipuri au o putere de separare extraordinară, cuprinsă între 10 Å și 1,7 Å, și o putere de mărire directă pe ecranul fluorescent de 250 000—300 000 ori (fig. 37, *a*, *b*).

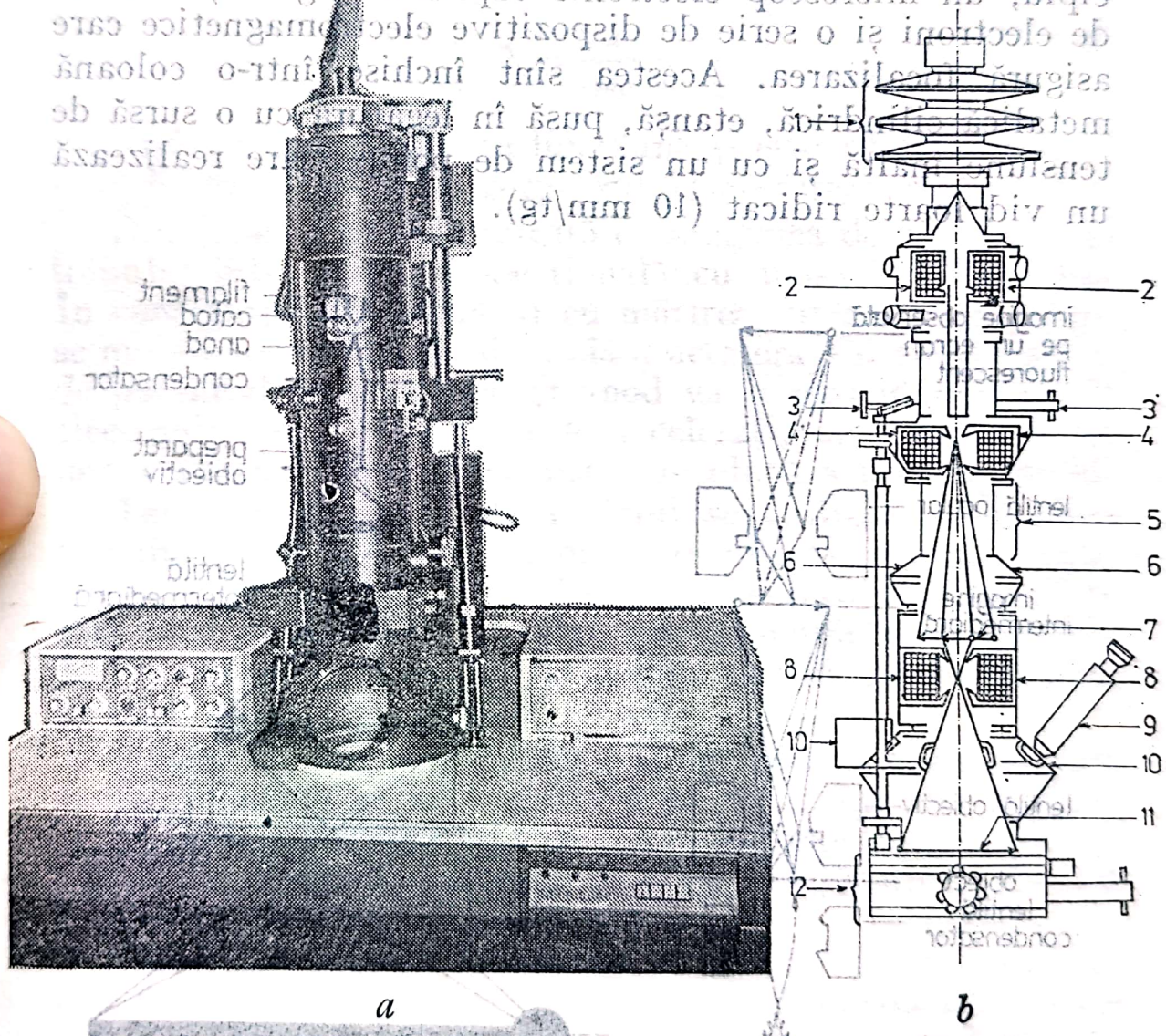


Fig. 37. Microscopul electronic (*a*) și schema acestuia (*b*):
1 — tubul catodic; *2* — bobina condensor; *3* — locul de introducere a obiectivului; *4* — bobina obiectiv; *5* — tubul obiectivului; *6* — locul de observare a imaginii intermediare; *7* — imaginea intermediară; *8* — bobina de protecție; *9* — ocularul pentru observarea imaginii finale; *10* — fereastra pentru observarea imaginii finale; *11* — imaginea finală; *12* — aparatul fotografic (după Scanga).

Scanned with OKEN Scanner

Puterea foarte mare de rezoluție constituie principala caracteristică tehnică a microscopului electronic. Acest progres se datorește utilizării fluxului de electroni a căror lungime de undă poate atinge 0,053 Å, adică de 100 000 ori mai mică decît lungimea de undă a spectrului vizibil. Lungimea de undă a electronului depinde de masa și viteza particulei. Viteza electronilor se stabilește prin tensiunea de accelerare a lor. Practic, toate structurile biologice pot fi puse în evidență cu ajutorul microscopului electronic, nefiind necesare rezoluții mai mari de 15—20 Å. În principiu, un microscop electronic cuprinde (fig. 38) o sursă de electroni și o serie de dispozitive electromagnetice care asigură focalizarea. Acestea sînt închise într-o coloană metalică cilindrică, etanșă, pusă în legătură cu o sursă de tensiune înaltă și cu un sistem de pompe care realizează un vid foarte ridicat (10 mm/tg).

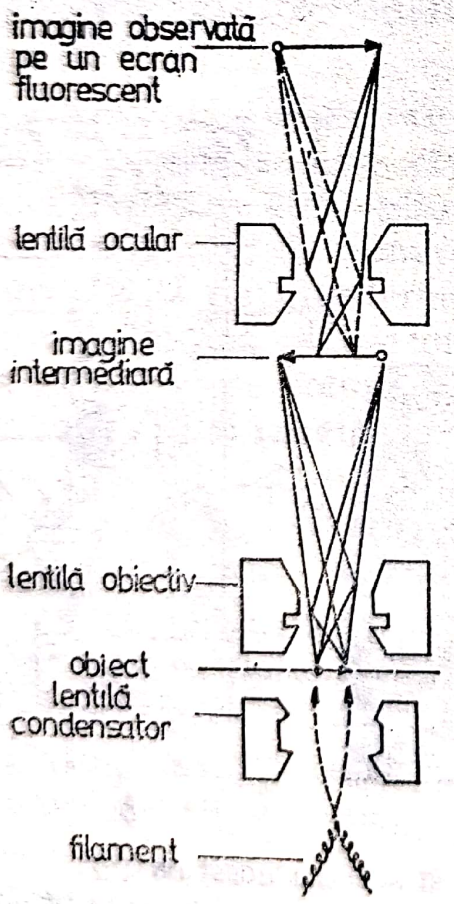


Fig. 38. Schema microscopului electronic și mersul fasciculelor de electroni.

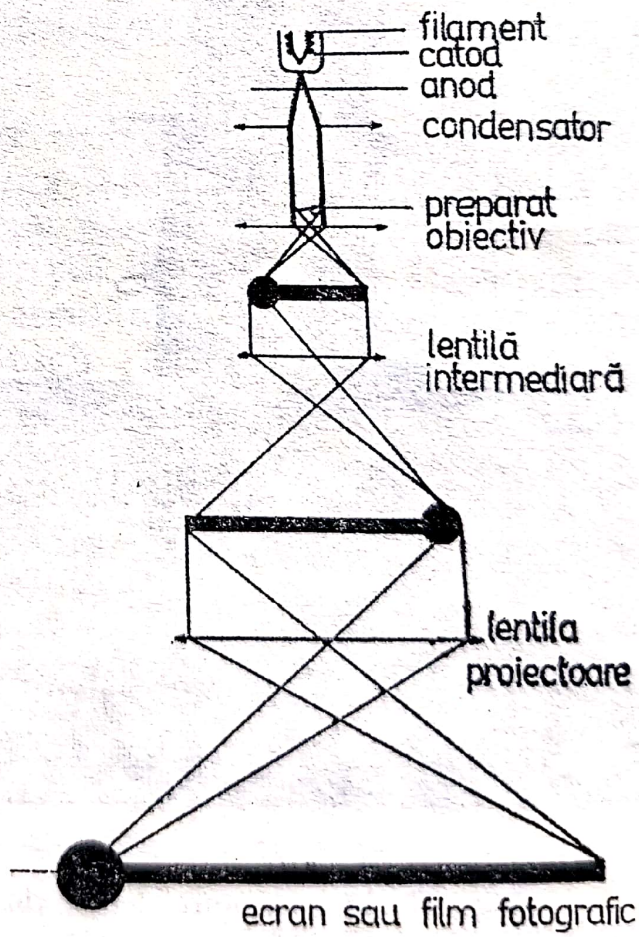


Fig. 39. Schema generatorului de electroni.

Scanned with OKEN Scanner

Generatorul de electroni sau tubul electronic este reprezentat de un filament de tungsten de forma literei „V". Acest filament catod, adus la incandescență, emite electroni care au rolul de sursă luminoasă (fig. 39). De la catod, electronii ajung la anod, care permite stabilirea cu catodul a unei diferențe de potențial de 50 000—100 000 V. Această tensiune mare, care trebuie să fie bine controlată și constantă, determină o accelerare a electronilor. Lungimea de undă corespunzătoare unei particule în mișcare se determină cu ajutorul relației:

$$\lambda = \frac{h}{mv},$$

Unde: h este constanta lui Plank și este egală cu $6{,}62 \cdot 10^{-27}$ erg.s; m—masa corpusculului; v—viteza corpusculului.

Din această formulă rezultă că lungimea de undă a electronului este invers proporțională cu masa și viteza lui. În consecință, proporțional cu mărirea vitezei electronilor se micșorează lungimea de undă a acestora. Cu cît diferența de potențial dintre catod și anod va fi mai mare cu atît electronii vor fi mai puternic accelerați, iar lungimea lor de undă scade, crescînd puterea de rezoluție a microscopului.

Tot prin intermediul anodului se realizează dirijarea fluxului electronic în axul optic al microscopului. Propagarea electronilor în linie dreaptă este posibilă numai în vid, ceea ce se obține în tubul microscopului prin punerea în funcțiune a sistemului de pompe pentru producerea vidului.

O sursă de electroni pentru a fi definită ca bună, trebuie să fie: intensă—pentru a putea evidenția detalii foarte fine; mică—pentru că suprafața de iluminare este foarte redusă; constantă—pentru a asigura condiții asemănătoare în tot timpul cît durează examinarea.

Electronii puternic accelerați au un traseu mai mult sau mai puțin divergent; ei vor străbate în continuare o serie de lentile electrostatice sau magnetostatice, analoage cu cele cunoscute de microscopia fotonică.

Condensatorul (sau bobina de inducție) (v. fig. 37, *b*) reprezintă o primă lentilă electromagnetică: el are rolul de a concentra electronii într-un fascicol drept și paralel,

Scanned with OKEN Scanner

asigurînd focalizarea lor pe obiectul de cercetat, în camera pentru preparat.

Fluxul electronic ajungînd la obiect (preparat), îl traversează sau nu, în funcție de densitatea și grosimea sa

Fascicolul de electroni, străbătînd preparatul, suferă ciocniri elastice sau neelastice cu atomii acestora. În ambele cazuri traiectoria electronului este însă deviată; devierea traiectoriei electronilor este cu atît mai mare cu cît greutatea atomică a formațiunilor examinate este mai mare, traiectoria electronului mai lungă și preparatul mai gros. Prin urmare, prin traversarea preparatului, electronii suferă deviații care-i fac din nou divergenți.

Obiectivul este o a doua lentilă (bobină) electromagnetică care grupează din nou electronii și servește la formarea primei imagini mărite a obiectului, numită imagine intermediară sau primară.

Ocularul reprezintă o a treia lentilă electromagnetică, formată de fapt dintr-un sistem de două lentile: lentila intermediară și lentila proiector. Acestea preiau imaginea intermediară, o măresc și o transformă într-o imagine finală ce este proiectată pe un ecran. Ecranul fiind construit din sulfură de zinc devine fluorescent sub influența bombardamentului de electroni și astfel permite observarea imaginii printr-un sistem de ferestre blindate. De gradul de împrăștiere și absorbție a electronilor de către obiect depinde contrastul imaginii.

Un sistem de *diafragme* (condensor, obiectiv, limitatoare de cîmp) îngustează fasciculul de electroni care cade pe preparat, pentru ca acesta să nu fie carbonizat, permițînd în același timp obținerea unei imagini de bună calitate.

Un alt dispozitiv, *stigmatorul*, servește la corectarea astigmatismului lentilelor.

La baza tubului microscopului sînt dispuse o serie de aparate care înregistrează valoarea și stabilitatea curentului de rețea, potențialul de accelerare a electronilor, intensitatea curentului care traversează lentilele electromagnetice și intensitatea vidului. Punerea la punct se realizează făcînd să varieze electric distanța focală a lentilelor magnetice.

Scanned with OKEN Scanner

Grosismente diferite se obțin prin variația simultană a curenților din bobinele obiectiv și ocular. Distanțele focale scurte se obțin în cîmpuri magnetice puternice produse de bobine blindate foarte apropiate.

Deși există o aparentă similitudine, imaginea electronică nu se formează ca cea optică; în timp ce radiațiile luminoase sînt absorbite la nivelul zonelor cu densitate mare pe care le traversează, electronii sînt dispersați în contact cu particulele dense ale materialului. Razele puternic dispersate ies din cîmpul aparatului, iar acelea care sînt puțin sau de loc dispersate ajung pe ecran unde produc un cîmp luminos. Părțile cele mai luminoase de pe ecranul fluorescent corespund deci zonelor mai subțiri sau cu o slabă densitate a materialului. Părțile mai întunecate corespund regiunilor mai dense sau mai groase, zone în care deviația razelor electronice a fost mai pronunțată.

Mecanismul de formare a imaginii într-un microscop electronic diferă deci fundamental de mecanismul cunoscut din microscopia optică.

În microscopia electronică nu examinăm preparatul ci imaginea acestuia proiectată pe ecranul fluorescent. Lentilele folosite în microscopia electronică produc, la fel ca orice sistem optic, o serie de deformări care limitează puterea rezolutivă a microscopului și scad calitatea imaginii. Deformările imaginii au ca origine următoarele aberații mai însemnate: aberația de sfericitate, distorsiunea, aberația cromatică, astigmatismul și difracția.

Aceasta este pe scurt schema simplificată a microscopului electronic prin transmisie la care sursa de lumină este înlocuită prin fluxul de electroni, mișcarea electronilor este dirijată de lentile electrice și magnetice, iar imaginea poate fi văzută numai datorită ecranului fluorescent. Azi se construiește o gamă variată de microscoape electronice, care pot fi clasificate după tipul lentilelor folosite în: microscoape electrostatice, magnetice și mixte.

Examinarea preparatelor cu microscopul electronic poate fi făcută prin mai multe procedee: transmisie, reflexie, emisie etc.

Microscoapele electronice universale sînt cel mai complexe, cu cele mai înalte performanțe tehnice, înaltă putere

Scanned with OKEN Scanner

de separare și putere de mărire maximă, avînd o largă utilizare în cercetările științifice.

Întocmirea preparatelor analizate la microscopul electronic implică o serie de metode și tehnici speciale.

În microscopia electronică se aplică azi o gamă variată de metode de prelucrare, de exemplu în funcție de materialul biologic ce urmează a fi analizat. Ele constituie de fapt o perfecționare a metodei clasice; etapele ce trebuie parcurse sînt în general aceleași, dar fiecare în parte comportă unele tehnici speciale.

Recoltarea materialului biologic trebuie făcută prin biopsie. În funcție de scopul urmărit, se alege organul, țesutul, etape de dezvoltare ontogenetică a acestora ca și momentul cel mai indicat din cadrul ciclului circardian. Fragmentele de organe și țesuturi recoltate, înainte de a fi fixate, trebuie împărțite în mici cubulețe a căror latură nu trebuie să depășească 0,5 mm, pentru a permite penetrația rapidă și uniformă a fixatorului în toată grosimea structurii.

Fragmentarea este de preferat să se facă cu o lamă de ras bine ascuțită. Cînd materialul biologic este prea moale, secționarea se face pe o hîrtie de filtru îmbibată cu soluție fixatoare.

Întrebuințarea foarfecelor și a penselor la recoltarea, fragmentarea și manipularea materialului este neindicată deoarece aceste instrumente produc presarea (tasarea) țesuturilor, deci deformarea lor.

Fixarea materialului reprezintă una dintre etapele cele mai importante, întrucît de reușita ei depinde calitatea secțiunilor. Azi se cunosc foarte multe soluții fixatoare dar dintre toate mai des folosite sînt următoarele patru:

— tetraoxidul de osmiu (OsO_4), soluția 1%—2%, la pH — 7,4;

— permanganatul de potasiu ($KMnO_4$), soluție 1%—2%, la pH — 7,4;

— aldehidă formică, soluție apoasă 10%;

— aldehidă glutarică ($OCH—(CH_2)_3—CHO$), soluție, apoasă 12%, folosită în amestec cu un tampon cacodilat 0,1 M.

Scanned with OKEN Scanner

Acidul osmic tamponat este fixatorul de elecție pentru studiul ultrastructurilor celulare, el realizînd o conservare fidelă a structurilor celulare.

Rezultate excelente se obțin cînd fixarea cu aldehidă glutarică este urmată de o fixare cu tetraoxid de osmiu. Agenții fixatori se depun în mod selectiv pe anumite structuri biologice determinînd la nivelul acestora un contrast special în cazul examinării la microscopul electronic. Contrastul astfel obținut se numește pozitiv. Prin mărirea densității ultrastructurilor, prin prelucrare cu diverse substanțe chimice fixatoare, pot fi evidențiate la microscopul electronic, formațiuni a căror dimensiune limitată este de cel puțin de 50 Å.

Pot fi observate și analizate infrastructuri cu dimensiuni și sub 50 Å, dar prin tehnica contrastului negativ, metodă ce constă în îmbinarea ultrastructurilor cu o soluție de acid fosfovolframic, urmată de uscarea lor rapidă. Pe ecranul microscopului electronic ultrastructurile apar luminoase pe un fond întunecat, adică invers decît în contrastul pozitiv.

Timpul de fixare variază de la 30 minute pînă la maximum 2 ore.

Dacă materialul este ținut în fixator mai mult de 2 ore, suferă unele modificări ireversibile nedorite, care denaturează structura inițială. În ceea ce privește temperatura la care trebuie să se facă această operație, cei mai mulți cercetători consideră că cele mai propice sînt temperaturile joase, 0°C—4°C.

Spălarea. După scurgerea timpului necesar unei bune fixări, fragmentele de material biologic trebuie bine spălate pentru oprirea acțiunii fixatorului și îndepărtarea acestuia din țesuturi. Spălarea se poate face în apă distilată, apă de robinet, sau în soluții tamponate și izotonice (de exemplu soluția Tyrode, Hanks), timp de o oră, schimbîndu-se de cîteva ori lichidul, la temperatura de 0°C—4°C.

Deshidratarea. Piesele bine spălate sînt apoi deshidratate prin trecerea lor printr-o serie de băi de alcool: 26%, 50%, 70%, 96%, 100%. Fiecare baie trebuie reînnoită după 2—3 min. Alcoolul absolut se schimbă de cel puțin

Scanned with OKEN Scanner

2 ori. În primele trei băi materialul este ținut 15—30 min; în prima baie de alcool absolut piesele se lasă o oră, iar în a doua 2 ore. Deshidratarea se face la 0°C, exceptînd cea de a doua baie de alcool absolut care este menținută la temperatura camerei. În alcool 70%, materialul biologic se poate lăsa de la o zi la alta sau poate fi conservat pentru mai mult timp.

Incluzionarea. Parafina obișnuită nu permite obținerea unor secțiuni corespunzătoare analizei la microscopul electronic. De aceea a fost necesară găsirea unor noi substanțe de includere. Diferiți autori au indicat variate substanțe: parafina dură, esterwaxul, ceara de carnauba amestecată cu parafină și ceară de albine etc., care azi au numai o valoare istorică, fiind de mult abandonate. Printre primele substanțe utilizate pentru incluzionare se numără și metacrilatul monomer, preconizat de Newman, Bolysko și Swerdlow (1949).

Mai bune rezultate le dă amestecul bine echilibrat de butil și metil-metacrilat. Dintre alte substanțe utilizate în mod frecvent în acest scop, menționăm: vestopalul W., Aralidita M și Epon 812. În ultimii ani au fost descoperite o serie de rășini miscibile cu apa (de exemplu Durcupanul): prin folosirea acestora se elimină operația de deshidratare și astfel se evită dizolvarea de către alcool sau acetonă a unor substanțe din celulă.

Incluzionarea în metacrilați se realizează în felul următor: piesele biologice se scot din cea de a doua baie de alcool și se cufundă în amestecul de monomeri fără inițiator, în care se lasă circa o oră, timp în care monomerul se schimbă de două ori. Această operație are rolul de a îndepărta alcoolul, acetona sau apa din fragmentul vegetal prin impregnarea acestuia cu rășina utilizată la includere.

După impregnarea corespunzătoare a materialului, piesele biologice se ordonează pe fundul unor mici capsule de gelatină, care ulterior se umplu cu substanță de includere. Pentru polimerizarea rășinii, capsulele cu material se introduc în etuvă la o temperatură bine stabilită în funcție de tipul rășinii utilizată pentru incluzionare (48°C pentru araldită; 56°C pentru metacrilatul de butil și metil etc.).

Scanned with OKEN Scanner

Incluzionarea în araldită se realizează în felul următor: Piesele biologice fixate, spălate și deshidratate, înainte de a fi incluzionate, trebuie impregnate cu araldită.

Pentru aceasta, piesele din alcool absolut sînt transferate într-un amestec constituit din:

Alcool absolut	2 părți
Araldită	1 parte
Anhidridă dodecil-succinică (întăritor)	1 parte

În acest amestec, piesele sînt lăsate 4—6 ore la temperatura de 48°C, după care sînt transferate în araldită pură amestecată cu întăritor (proporții egale) în care stau 24 de ore la temperatura camerei. Impregnarea este efectuată printr-un ultim transfer, timp de 24 ore, la temperatura camerei, într-un amestec cu următoarea compoziție:

Araldită M	10 ml
Anhidrită dodecil-succinică (întăritor)	10 ml
Dibutilftalat (plastificant)	1 ml
Tridimetilaminometilfenol (accelerator)	0,5 ml

Astfel impregnate, piesele biologice se ordonează pe fundul capsulei de gelatină care se umple apoi cu araldită. Polimerizarea se face în etuvă termostat la 48°C, în circa 48 de ore.

Secționarea blocului. Blocurile cu material inclus, înainte de a fi secționate, trebuie fasonate, în sensul că vîrful lor să aibă forma unei piramide cu înălțimea de 0,2—0,3 mm. Operația de fasonare se realizează sub o lupă binocular cu ajutorul unei lame de ras, bine ascuțită, montată într-un mîner special. Printr-o așchiere cît mai fină, trebuie realizată o îndepărtare treptată a excesului de material din bloc, evitînd atingerea sau torsionarea pieselor biologice. Blocul astfel finisat se fixează pe portobiectul ultramicrotomului și este secționat. Operația de secționare și de manipulare a secțiunilor se face sub microscop, deoarece secțiunile sînt invizibile cu ochiul liber. Secțiunile sînt culese într-o mică cuvă (baie) plină cu alcool 25% sau acetonă 10, 6, 25%, fixată pe muchia cuțitului. Secțiunile succesive formează o bandă care se întinde pe suprafața soluției din baie. Pentru a evita unele dilatări nedorite ale pieselor microtomului, se recomandă ca iluminarea să se facă cu o

Scanned with OKEN Scanner

lampă fluorescentă. Grosimea secțiunilor poate fi apreciată după culoarea lor în lumină reflectată. Astfel, culoarea gri (cenușiu) indică o grosime de circa 600 Å, cea argintie de 600—900 Å, cea aurie de 900—1 500 Å etc.

Montarea secțiunilor. În microscopia electronică nu se folosesc ca suport pentru preparate lame de sticlă, deoarece acestea nu pot fi traversate de fascicolul de electroni. În acest scop, se folosesc suporturi speciale numite grile. Grilele sînt plase sau rețele de cupru, bronz fosforos sau nichel, cu diametru de 3 mm, iar suprafața unui ochi de circa 100 μ^2. Grilele suport se acoperă cu o peliculă organică a cărei grosime nu trebuie să depășească 200 Å.

Frecvent sînt utilizate peliculele din material plastic (colodiu 1,5% în acetat de amil sau acetonă și formvar polivinilformol 1% în cloroform sau dioxan). Pentru rezoluții, se folosesc peliculele de carbon, berilice sau silicice, care rezistă mai bine la bombardamentul cu electroni.

Pe grilele astfel pregătite se montează banda cu secțiuni ce plutește pe suprafața soluției din baie. Pentru așezarea secțiunilor pe grile, procedeele sînt diverse: mai adesea ele se culeg din baie cu ajutorul unei baghete de sticlă și sînt depuse pe grilă; alteori, grila cu pelicula în jos se așază deasupra secțiunilor; prin ridicarea grilei, cu multă precauțiune, secțiunile, împreună cu o picătură de soluție, rămîn lipite de pelicula organică. Fixînd grila în această poziție, după o perioadă lichidul se evaporă, iar banda cu secțiuni rămîne lipită cu materialul plastic.

Colorarea secțiunilor. Adesea secțiunile nu prezintă contrastul necesar pentru evidențierea corespunzătoare a infrastructurilor biologice. De aceea, se impune accentuarea contrastului prin colorații elective. Coloranții utilizați în microscopia electronică diferă fundamental de cei obișnuiți în microscopia optică. Coloranții electronici realizează fie o creștere a grosimii preparatului, fie o sporire a greutății moleculare a preparatului fie o mărire a numărului de atomi pe unitatea de suprafață. Consecința acțiunii coloranților este creșterea numărului de împrăștieri a electronilor, prin urmare accentuarea contrastului preparatului.

Scanned with OKEN Scanner

Toți coloranții utilizați în microscopia electronică conțin în molecula lor un atom cu greutate atomică mare, care realizează o împrăștiere accentuată a electronilor.

Substanțele colorante cu cea mai bună întrebuințare sînt: acidul fosfotungstic, acidul fosfo-wolframic, acetatul de uranil, acetatul de plumb. Colorarea secțiunilor se poate face înainte sau după montarea lor pe grile, iar uneori chiar înainte de incluzionarea fragmentelor de material biologic. Dacă colorarea se realizează înainte de montare, secțiunile se transferă din baie într-o altă baie cu soluție colorantă. Ele plutesc pe suprafața soluției, unde se lasă 20—40 min, după care se spală în apă și se montează pe grile. În cazul în care secțiunile sînt deja montate pe grile, se depune pe grile o picătură de colorant. După scurgerea timpului necesar, grilele se clătesc în apă distilată, demineralizată, și se pun la uscat. Grilele astfel pregătite se așază în cutii speciale (sau cutii Petri) pentru a se usca și a fi ferite de praf. După cîteva zile ele pot fi examinate la microscopul electronic.

Metalizarea, colorația negativă, replica de carbon sînt numai cîteva dintre metodele și tehnicile utilizate în cercetările de microscopie electronică.

În anul 1944 s-a pus la punct tehnica umbririi prin metalizare a preparatelor electronice. Obiectul se acoperă unilateral prin pulverizare cu un strat fin metalic, de obicei aur, platină, cobalt sau vanadiu, care îngreunează pătrunderea razelor electronice prin porțiunile expuse metalizării. Prin aceasta, fotografiile electronice capătă contraste și o plasticitate pe care nu o aveau altă dată. Această tehnică este deosebit de utilă la studiul morfologiei vitusurilor și a frotiurilor de sînge.

Pentru obținerea electronofotografiilor (planșele XI, XII, XIII), se folosesc plăcile fotografice foarte sensibile care suferă aceleași operații de developat și fixat arătate în cadrul capitolelor anterioare.

Rezultatele obținute cu microscopul electronic sînt numeroase. S-au putut fotografia molecule mari, cum ar fi cea de hemocianină și s-au evidențiat ultrastructura celulei vegetale (planșa XII) și animale cu principalele organite celulare precum și forma și dimensiunile diverselor specii de bacterii și virusuri.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul

VI

Tabele și rețete practice

Tabelul 22

Uleiuri de imersie

Materialul	Indicele de refracție
Sticla lentilei frontale	1,55589
Ulei de cedru	1,51525
Ulei de imersie sintetic (Carl Zeiss)	1,515
Anisol pur	1,5163
Apă distilată	1,33302
Glicerină + apă distilată	1,47158
Monobromnaftalină	1,65820

Tabelul 23

Identificarea mediului de imersie ce se folosește la un obiectiv

Mediul de imersie	Culoarea inelului	Simbol
Ulei de imersie	Negru	HI sau OI
Apă	Alb	W
Glicerină	Roșu	Glyc
Monobromnaftalină	Galben	Monobromnaphth

Scanned with OKEN Scanner

Rețete pentru filtre lichide

Filtru portocaliu (oraj)

Bicromat de potasiu . . . . . .4 g
Permanganat de potasiu . . . . . .0,026 g
Apă distilată pînă la 100 cm³.

La grosimea de 10 mm, permite trecerea razelor cu lungimea de undă de peste 570 m μ.

Filtru verde

Sulfat de cupru . . . . . .175 g
Bicromat de potasiu . . . . . 17 g
Acid sulfuric concentrat . . . . . 2 cm
Apă pînă la 500 cm³.

La o grosime de 10 mm, permite trecerea razelor de lumină între 550—590 m μ.

Filtrul pentru infraroșu

Iodură de potasiu . . . . . 40 g
Iod . . . . . 20 g
Apă pînă la 100 cm³.

Permite trecerea razelor du lungimea de undă dincolo de 710 m μ.

Tabelul 24

Filtre pentru microfotografiere (Catalog Jena nr. *8040*)

Simbol	Caracteristici	Întrebuințări
BG 17	Sticlă aproape incoloră, absoarbe puternic căldura	Filtru de răcire Protecție contra căldurii
NG 4	Sticlă neutră medie	Permite trecerea razelor roșii și calorice
RG 5	Roșu închis	Filtre de oprire pentru fotografierea în infraroșu
GG 11	Galben închis	Filtru pentru contrast, oprește albastrul
VG 4	Galben verzui	Filtru pentru acromatice

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 24 (continuare)

Simbol	Caracteristici	Întrebuințări
BG 3	Transparent pentru ultraviolet și roșu	Filtru albastru strict
BG 7	Albastru închis	Cu GG 11 dă un filtru verde monocromat
UG 1	Violet închis	Pentru lucrul în ultraviolet de mare lungime de undă
BG 34	Albastru violet pentru lumină zilei	Egalizează lumina lămpii cu lumina zilei

Filtrul albastru

Sulfat de cupru . . . . . 10 g
Apă pînă la 150 cm².
Amoniac pînă la dizolvarea precipitatului.

Printr-un filtru cu grosimea de 10 mm, trec numai razele existente între 430—480 m μ.

Benzile de absorbție ale unor coloranți biologici, μ

Fuxină acidă	0,53—0,56
Fuxină bazică	0,51—0,55
Albastru de anilină	0,55—0,62
Carmin	0,50—0,57
Violet cristal	0,55—0,61
Eosină	0,49—0,54
Hematoxilină	0,56—0,64
Verde de metilen	0,62—0,65
Albastru de metilen	0,60—0,62 și 0,65—0,68
Nigrosină	0,58—0,60
Roșu negru	0,48—0,55
Portocaliu II	0,46—0,51
Portocaliu G	0,47—0,50
Safranină	0,48—0,54
Sudan III și IV	circa 0,50
Albastru de toluidină	0,55—0,65

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 25

Caracteristicile unor filme și plăci Agfa

Materialul	Sensibilitatea, DIN	Sensibilitate cromatică	Puterea de rezoluție	Culoarea suportului	Filtru la camera obscură
Agfa Isochron	17/10	Ortocromatic	78(—2)	gri	107
Isopan FF Special Feinkorn	10/10	Ortopancromatic	115(—5)	gri	108
Isopan F Feinkorn	17/10	Ortopancromatic	91(—3)	gri	108
Isopan ISS Superspecial	21/10	Ortopancromatic	65(—2)	gri	108
Isopan Ultra	23/10	Ultrapancromatic	60(—4)	gri	108

Tabelul 26

Planfilme Agfa*)

Materialul	Sensibilitatea, DIN	Sensibilitatea cromatică	Puterea de rezoluție	Filtru la camera obscură
Isopan F Planfilm	17/10	Ortopancromatic	75(—3)	108
Isopan ISS Planfilm	21/10	Pancromatic	53—(3)	106

*) se pot folosi în locul plăcilor foto.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 27

Plăci fotografice AGFA

Materialul	Sensibilitatea	Sensibilitate cromatică	Putere de rezoluție	Durata de păstrare	Filtrul camerei obscure
Plăci Agfa Isochrom	18/10 DIN	Ortocromatic	65(—4)	2 ani	107
Plăci Agfa Ultra special	18/10 DIN	Ortocromatic	64(—3)	2 ani	107
Plăci Agfa Isopan F.	17/10 DIN	Ortopancro-matic	67(—4)	2 ani	108
Plăci Agfa Isopan ISS	21/10 DIN	Pancromatic	65(—4)	2 ani	108
Plăci Agfa Ultra Fino-pan	16/10 DIN	Ortopancro-matic	70(—3)	11/2 ani	108
Plăci Agfa-press	25/10 DIN	Pancromatic	50(—2)	1 ani	108
Plăci Agfa ultraviolet	—	Sensibil UV 200—400m	80(—5)	1 ani	107
Infraroșu 700 Hart	640—740 m μ	—	60	6 luni	108
Infraroșu 750 Hart	690—770 m μ	—	60	6 luni	108
Infraroșu 800 Hart	750—880 m μ	—	60	6 luni	108
Infraroșu 850 Hart	790—880 m μ	—	60	6 luni	114
Infraroșu 700 „Rapid“	640—760 m μ	—	45	5 luni	108
Infraroșii 750 „Rapid“	730—790 m μ	—	45	5 luni	108
Infraroșu 800 „Rapid“	740—850 m μ	—	40	5 luni	108
Infraroșu 850 „Rapid“	750—870 m μ	—	40	5 luni	114
Infraroșu 950	950 m μ	—	40	1 lună	114
Infraroșu 1050	1050 m μ	—	40	1 lună	114

Scanned with OKEN Scanner

Sensibilitatea cromatică

Lumină ultravioletă	(100—400 mμ)	— sensibilitate U.V.
Lumină albastră și violetă	(400—500 mμ)	— nesensibilizat
Lumină violetă, albastră, verde și galbenă	(400—600 mμ)	— ortocromatic
Lumină violetă, albastră, verde, galbenă și roșie	(400—700 mμ)	— pancromatic și ortocromatic
Lumină violetă, albastră și infraroșie	400—500 mμ 700—1 100 mμ	— sensibil la raze infraroșii

Tabelul 28

Expunerile succesive în cazul folosirii plăcilor fotografice

Nr. fișei expuse	I	II	III	IV	V	VI	VII
Expuneri, s	1	1 1	1 1 2	1 1 2 4	1 1 2 4 8	1 1 2 4 8 16	1 1 2 4 8 16 32
Total expuneri	1	2	3	8	16	32	64

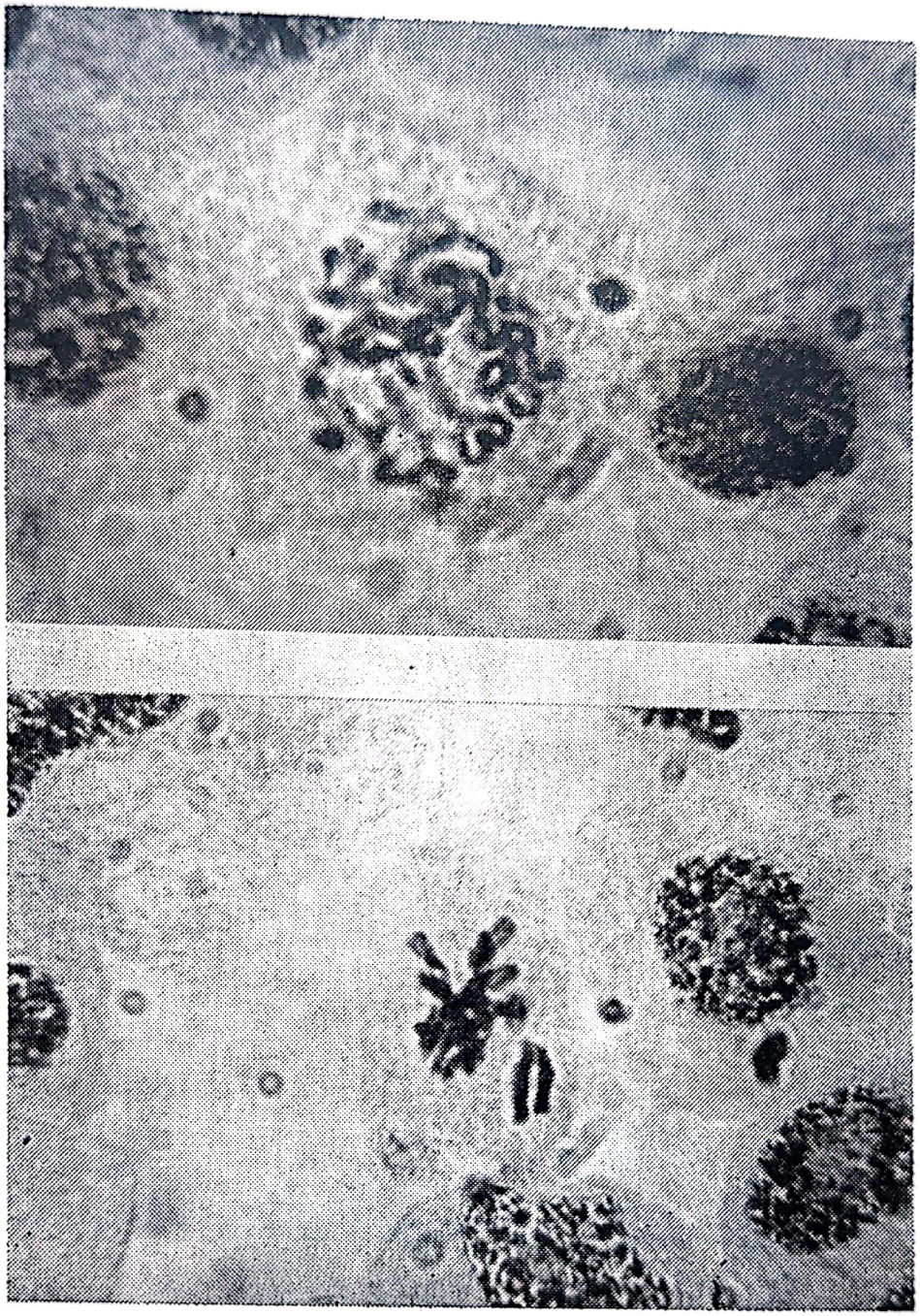
Bibliografie

1. ADERCA, I., IANCONESCU M., *Culturi de celule în inframicrobiologie*, Editura Academiei R.P.R., București, 1962.
2. ANDREI M., RĂDULESCU DIDONA, *Caiet pentru tehnica preparării și conservării materialului biologic*, Univesritatea București, 1972.
3. ANGHEL I., *Lucrări practice privind studiul cromozomilor în mitoză și meioză*. În Natura, nr. 3, București, 1969.
4. ANGHEL I., TOMA N., *Citologie vegetală* (Lucrări practice), Universitatea București, Facultatea de Biologie, București, 1975.
5. ANGHEL I., BREZEANU A., TOMA N., *Ultrastructura celulei vegetale*. Atlas, Editura Academiei R.S.R., București, 1980.
6. AUDREY M., *Practical Methods in Electron Microscopy*. North-Holland American Elsevier, 1975.
7. BOICESCU S., *Fotografia la mică distanță și macrofotografia*, Editura tehnică, București, 1968.
8. BUBULAC A., *Laboratorul fotoamatorului*, Editura tehnică, București 1968.
9. DE VAUCOULEURS G., GRAGESCO J., SELME P., *Manuel de photographie scientifique*, Editions de la Revue d°Optique, Paris, 1956.
10. GAVRILĂ L., *Genetica algelor*, Editura Academiei R.S.R., București, 1978.
11. GOLDHAAR I., *Microfotografia*, Editura tehnică, București, 1957.
12. IEREMIA T., *Microbiologie medicală aplicată*, Institutul de Medicină și Farmacie, București, 1962.
13. LANGERON M., *Precis de microscopie*, Collection de precis medicaux Masson et Cie Paris, 1942.
14. PAUȘEVA Z.P. *Practicum poțitologhii rastenii*, Izdatelstovo Rolos, Moskva, 1970.
15. PERELLI V., *Makro et microphotographie*, Progresso Photographico, Paris, 1967.
16. PIZON P., *Photomacrographie et Photomicrographie*, Edition de la Revue d'Optique, Paris, 1949.
17. PLOAIE P.G., PETRE ZOE, *Introducere în microscopia electronică, cu aplicații în biologia celulară și moleculară*, Editura Academiei R.S.R., București, 1979.
18. PORTOCALĂ R., IONESCU I.N., *Microscopia electronică în biologie și inframicrobiologie*, Editura Academiei R.P.R., București, 1962.
19. TARNAVSCHI I.T., G. ȘERBĂNESCU—JITARIU, N. MITROIU, D. RĂDULESCU, *Practicum de morfologie și anatomie vegetală*, Universitatea București, Facultatea de Biologie, 1974.
20. ZARNEA GH., *Microbiologie*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1963.

Scanned with OKEN Scanner

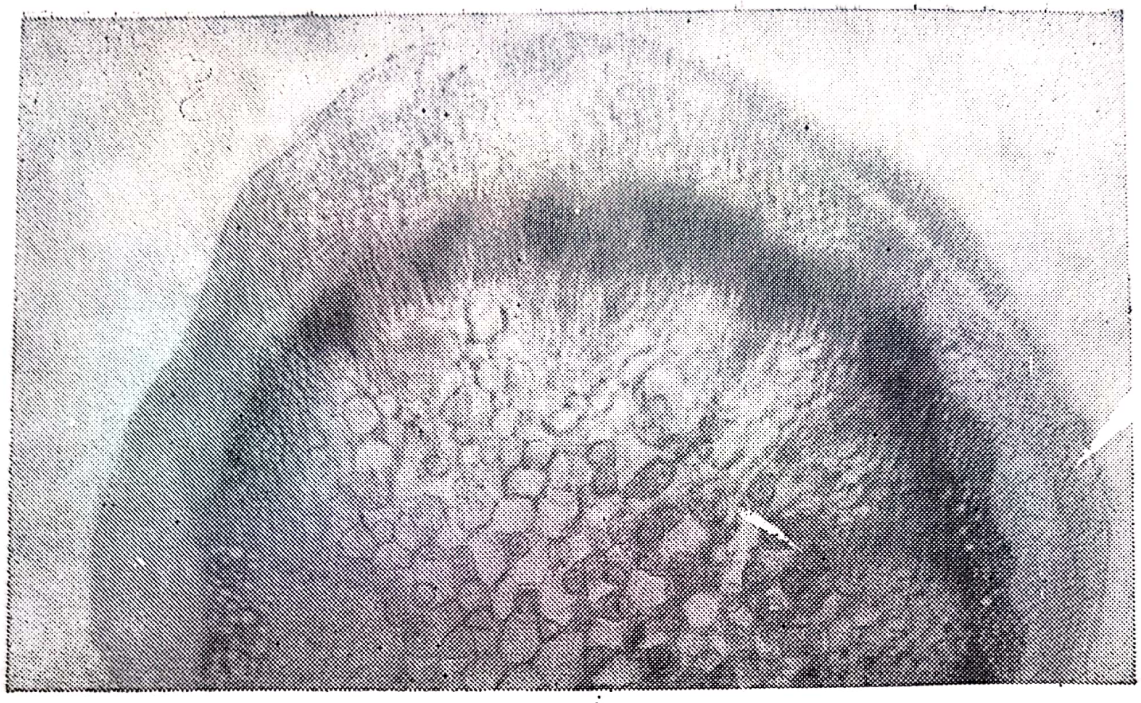
PLANŞE

Scanned with OKEN Scanner

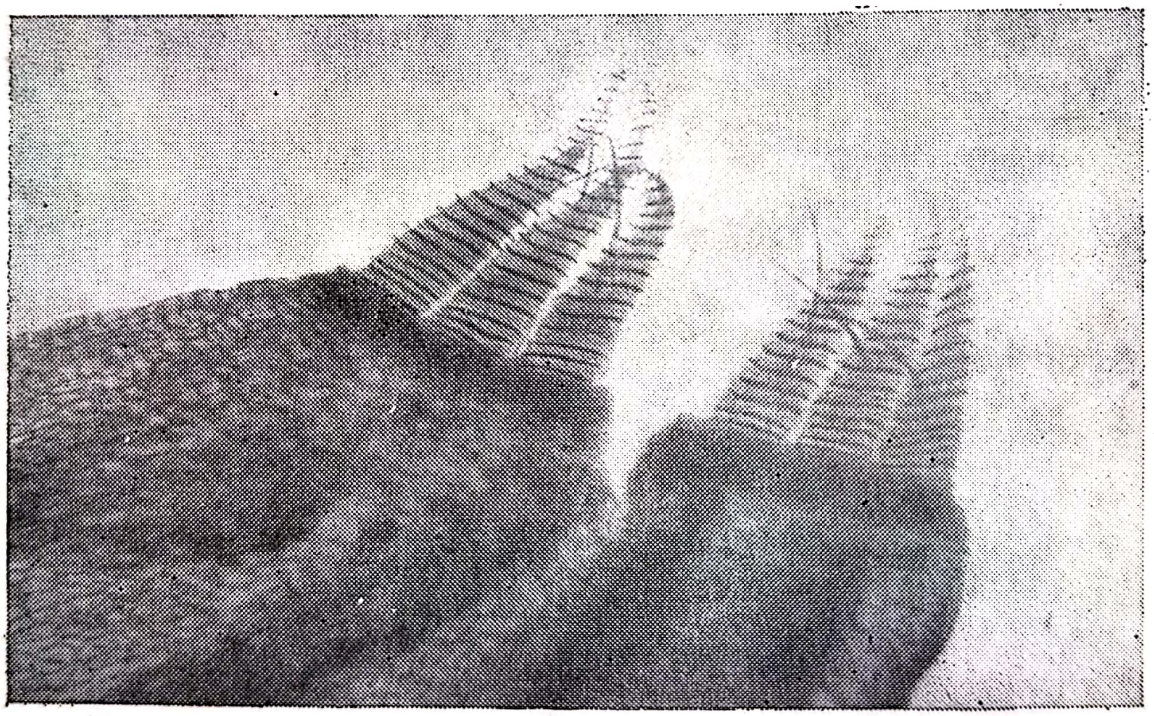


Planșa I. Faze ale diviziunii mitotice la Allium cepa, evidențiate la microscopul optic (ob. 8, oc. 15) (foto N. Toma).

Scanned with OKEN Scanner



1

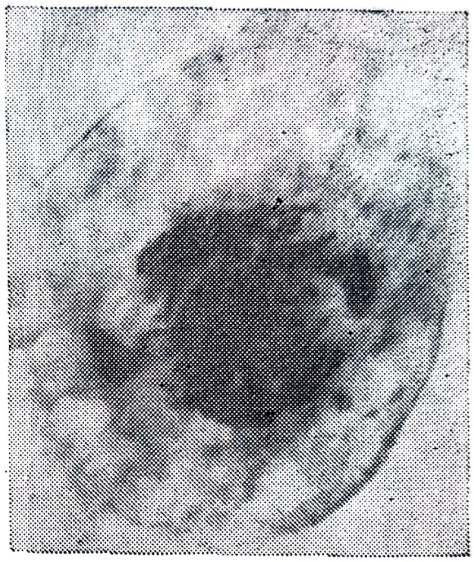


2

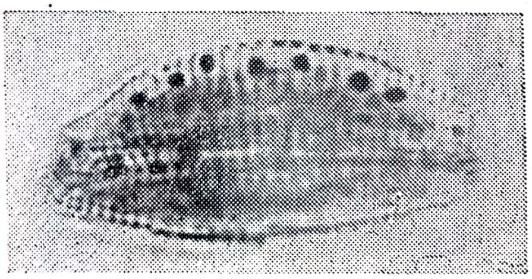
Planșa II. Evidențierea unor structuri la microscopul optic: fig. *1* — secțiune transversală prin tulpina de Capsella bursa-pastoris, parazitată de Cystopus candidus (ob. 8, oc. 15) (foto Gh. Mohan); fig. *2* — structura peristomiului de la Funaria hygrometrica la microscopul optic (ob. 40, oc. 7), (foto Gh. Mohan).

Scanned with OKEN Scanner

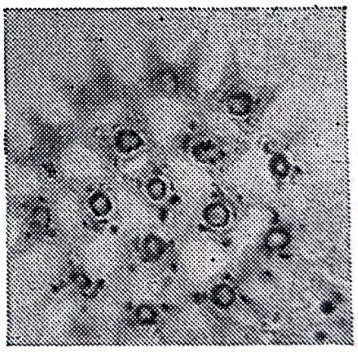
1



2



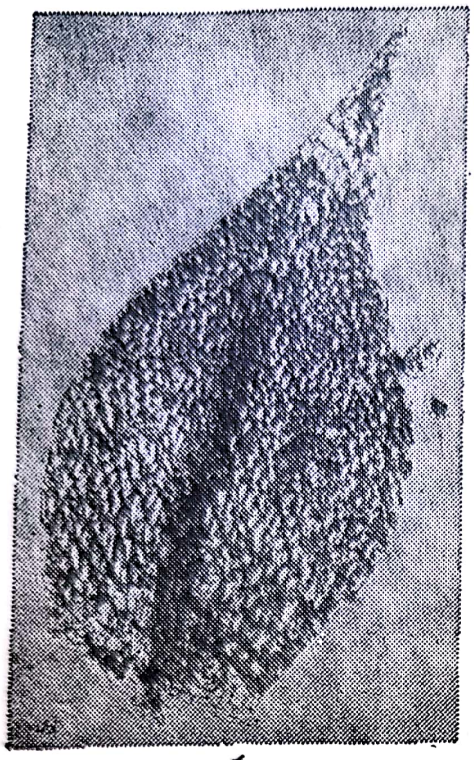
3



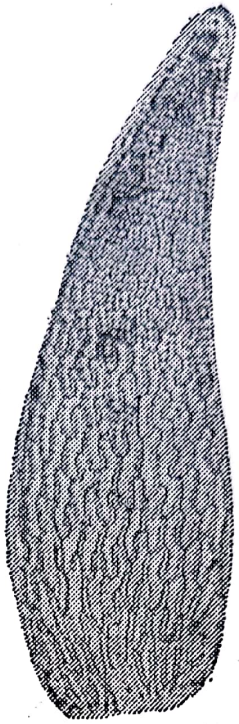
4

Planșa III. Structuri microscopice: fig. *1* — garnitura cromozomală la om; fig. *2* — garnitura cromozomală la Euglena terricola; fig. *3* — Cymbella sp.; fig. *4* — Pediastrum sp. (ob. 8, oc. 15), (foto L. Gavrilă).

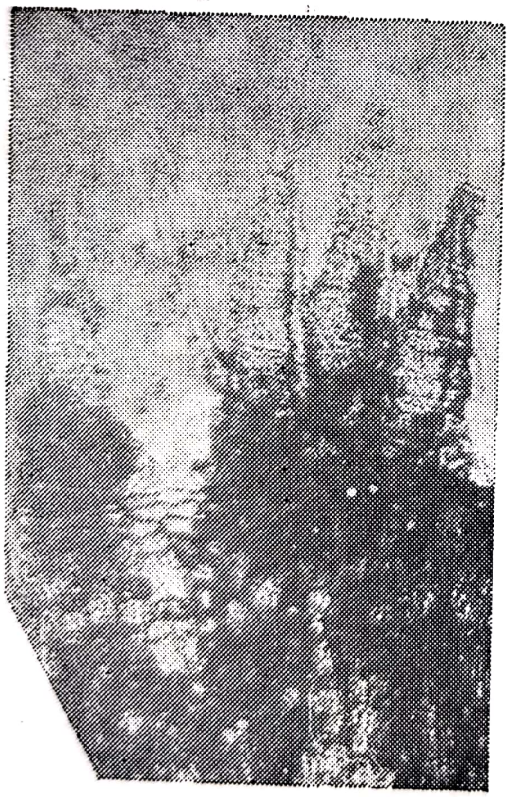
Scanned with OKEN Scanner



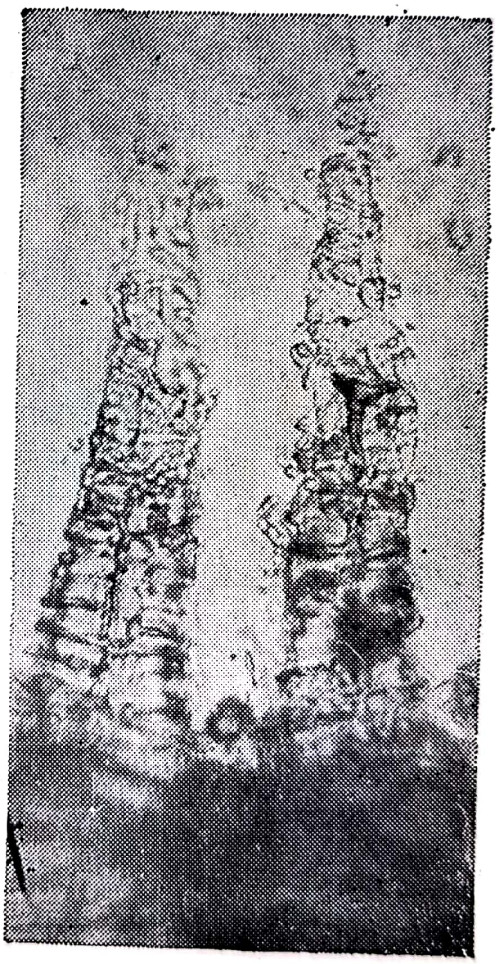
1



2



3

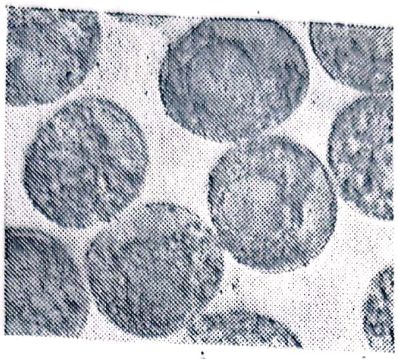


4

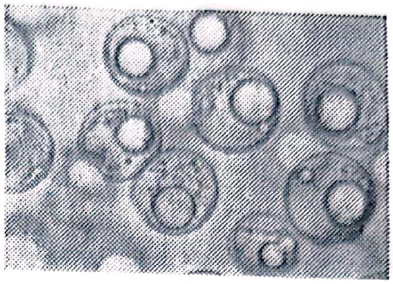
Planșa IV

1 — structura frunzei la *Anacamptodon splachnoides*; *2* — structura frunzei de la *Sphagnum sp*; *3* — structura peristomiului la *Anacamptodon splachnoides*; *4* — structura peristomiului la *Habrodon perpusilus* (foto Gh. Mohan)

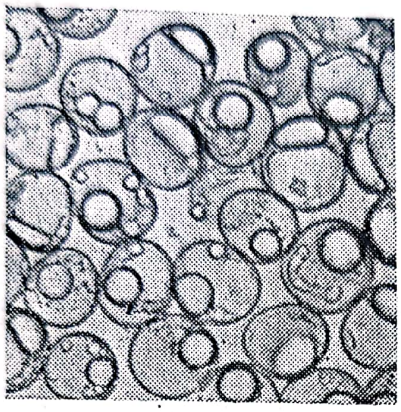
Scanned with OKEN Scanner



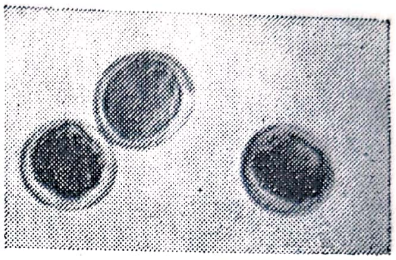
1



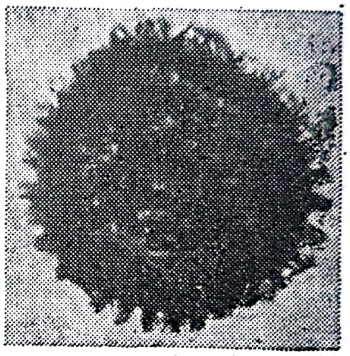
2



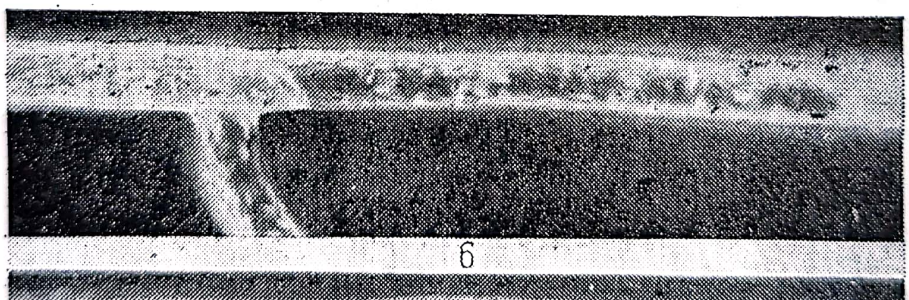
3



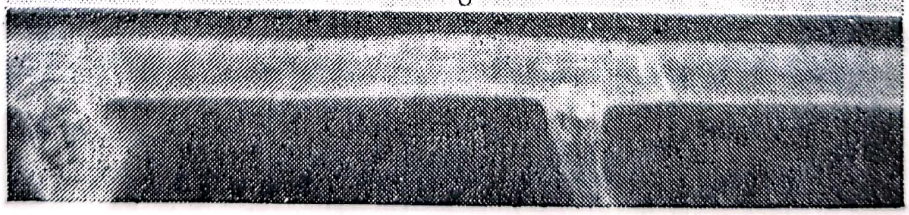
4



5



6



7

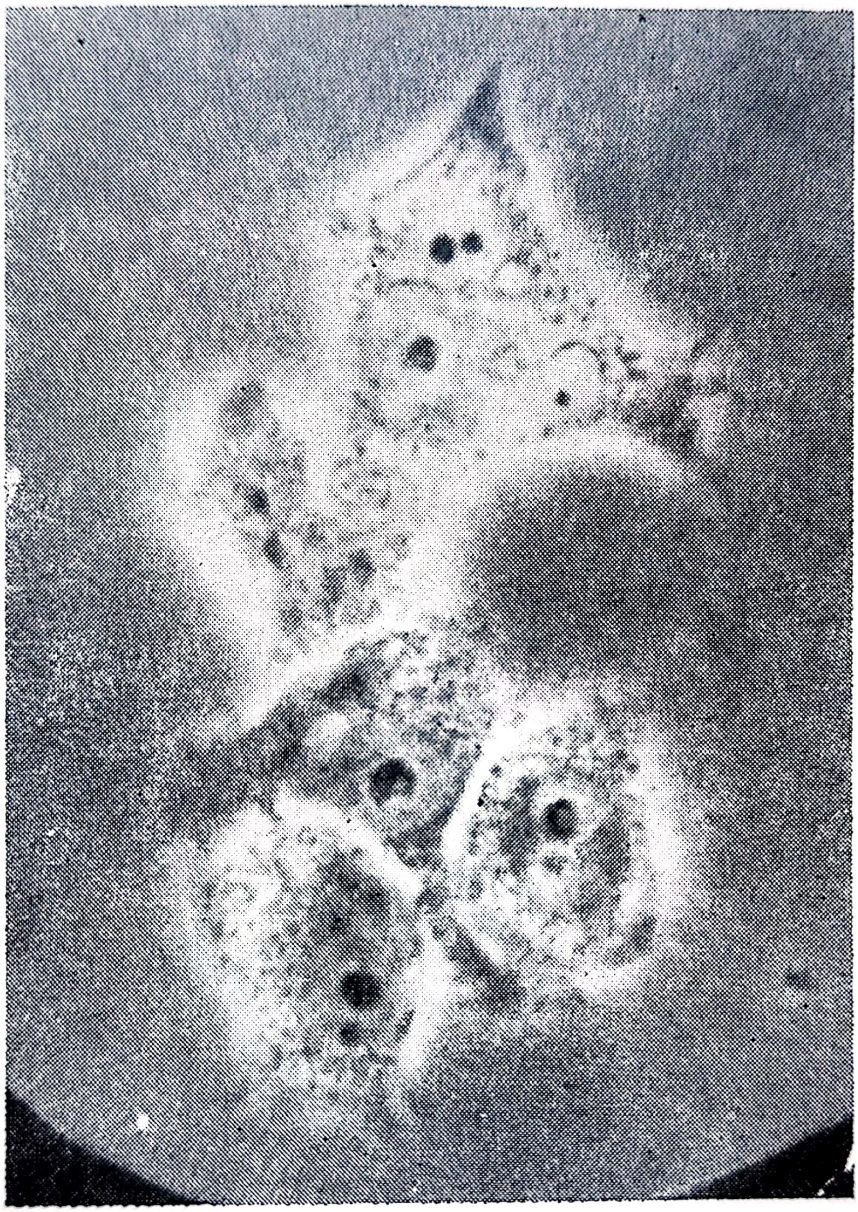
Planșa V:

1 — structura sporilor de la *Dolichotheca seligeri*; *2* — structura sporilor de la *Bartramia ithyphylla*; *3* — structura sporilor de la *Bartramia pomiformis*; *4* — structura sporilor de la *Tetraplodon angustatum*; *5* — structura sporilor de la *Fossombronia wondraczekii*; *6, 7* — structura protonemei de la Dolichotheca seligeri (foto Gh. Mohan).

Scanned with OKEN Scanner

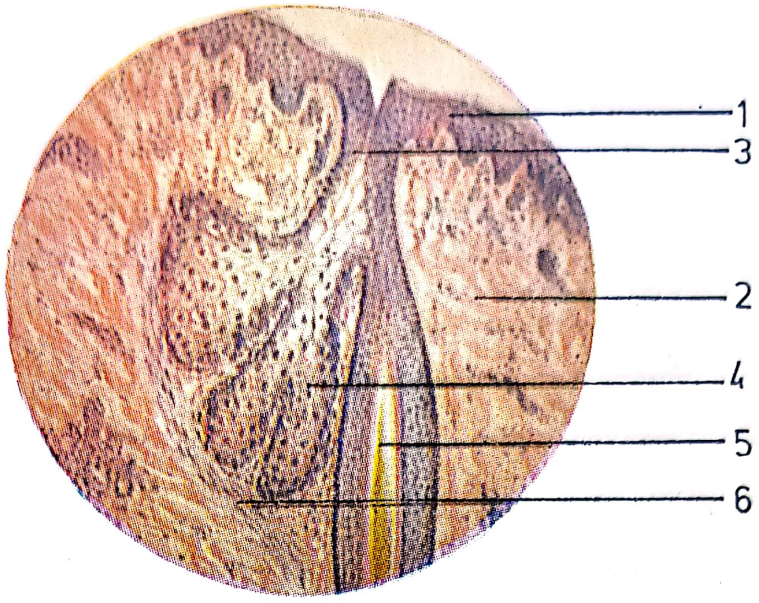
Planșa VI. Nostoc commune, fotografie in cîmp intunecat

Scanned with OKEN Scanner

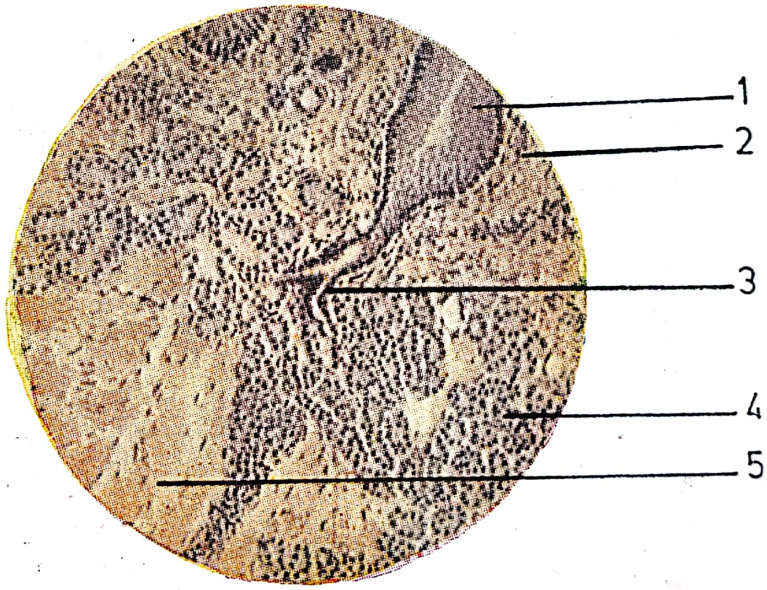


Planșa VII. Culturi de celule epiteliale microfotograficcate în contrast de fază (după Aderca și Ianconescu).

Scanned with OKEN Scanner



1.



2.

Planșa VIII. Microfotografie în culori:

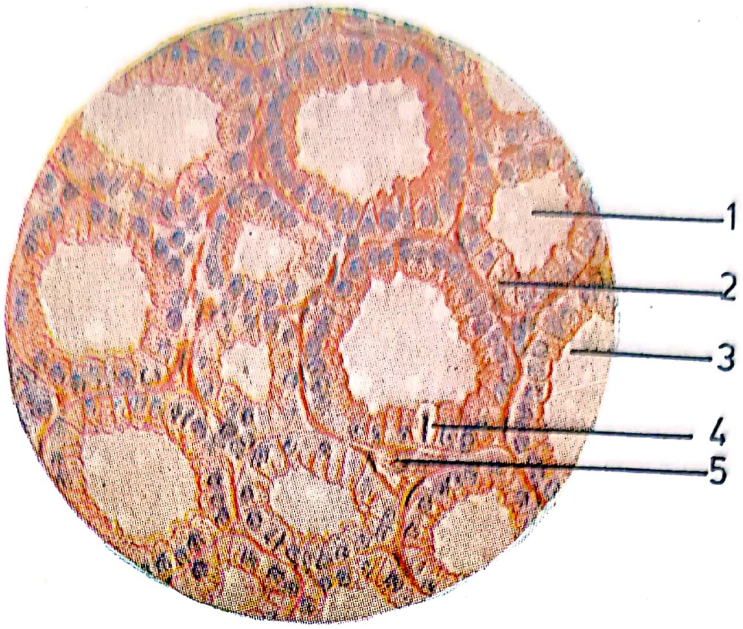
fig. *1* — glanda sebacee din tegument (ob. 8, oc. 15):

1 — epiteliul pavimentos pluristratificat; *2* — țesut conjunctiv; *3* — canal excretor al glandei *4* — porțiunea ramificată a glandei; *5* — rădăcina părului; *6* — mușchiul ridicător al părului (colorație hematoxilină-eozină);

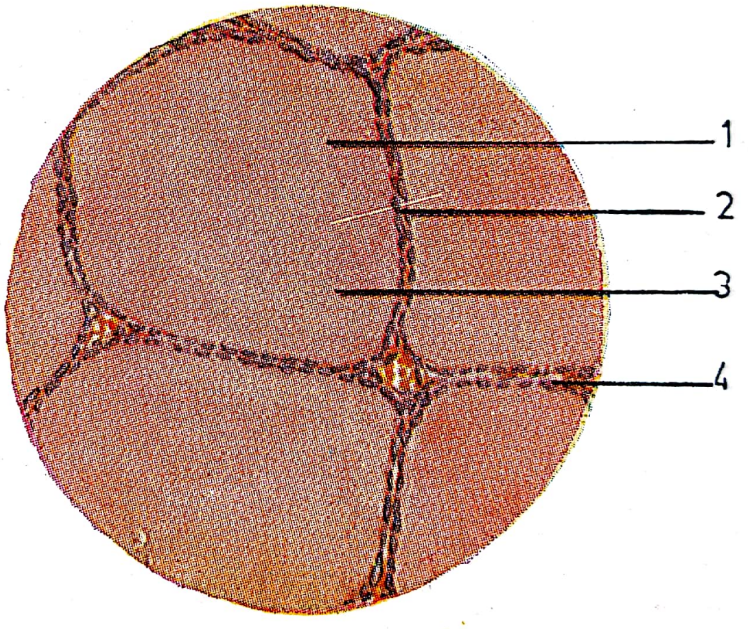
fig. *2* — glanda salivară a limbii (ob. 8, oc 15):

1 — epiteliul pavimentos pluristratificat al limbii; *2* — țesut conjunctiv; *3* — canalul excretor al glandei; *4* — porțiunea terminală a glandei; *5* — mușchi striați.

Scanned with OKEN Scanner



1.



2.

Planșa IX. Fig. *1* — secțiune prin tiroida de om (hiperfuncție) (ob. 40, oc. 10):

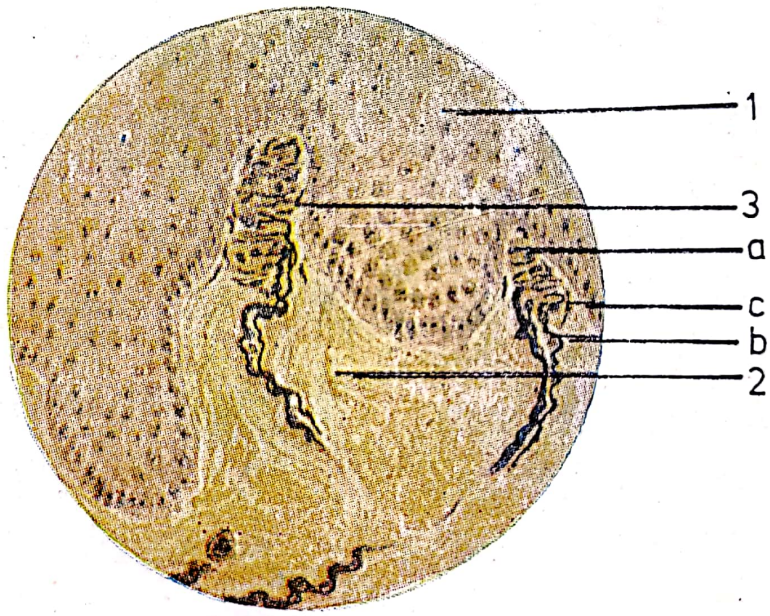
1 — folicul; *2* — epiteliul înalt al foliculului; *3* — vacuole în coloid; *4* — celulă în mitoză al epiteliului folicular; *5* — țesut conjunctiv cu vase sanguine (colorație hematoxilin-eozină);

fig. *2* — secțiune prin tiroida de om (hipofuncție) (ob. 40, oc. 10);

1 — folicul; *2* — epiteliul turtit al foliculului; *3* — coloid; *4* — țesut conjunctiv cu vase sanguine (o colorație hematoxilin-eozină).

Scanned with OKEN Scanner

1.



2.

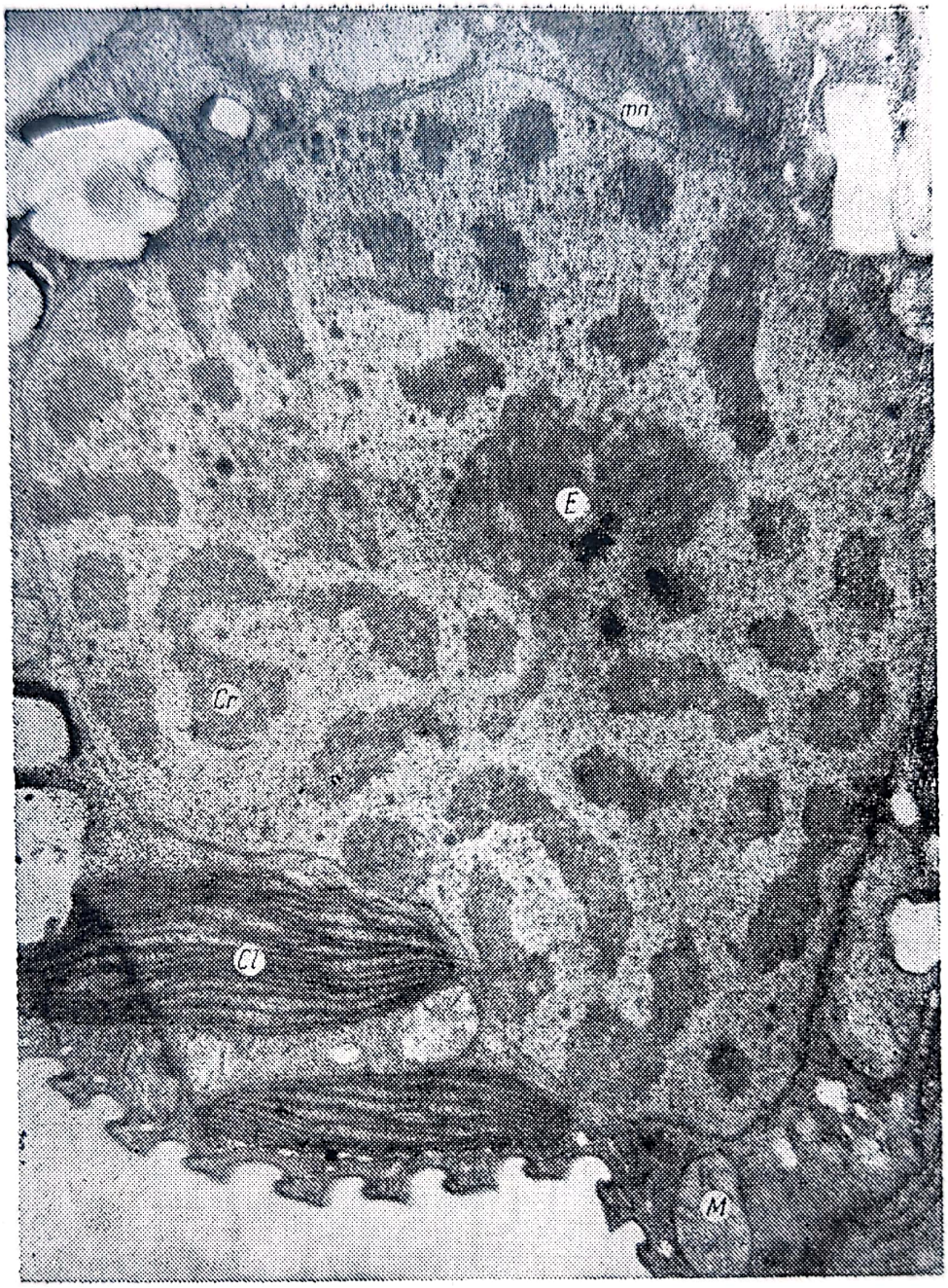
Planşa X. Fig. *1* — Corpusculii lui Vater—Pacini din pancreas (ob. 8, oc. 15):

1 — porţiunile secretoare ale pancreasului; *2*, *3* — secţiune longitudinală prin corpusculul lui Vater-Pacini; *a* — lamele de ţesut conjunctiv al capsulei; *b* — porţiunea centrală; *4* — nerv care ajunge la corpusculul lui Vater-Pacini (coloraţie hematoxilin-eozină).

Fig. 2. Corpusculul lui Meissner din tegument (ob. 40, oc. 7):

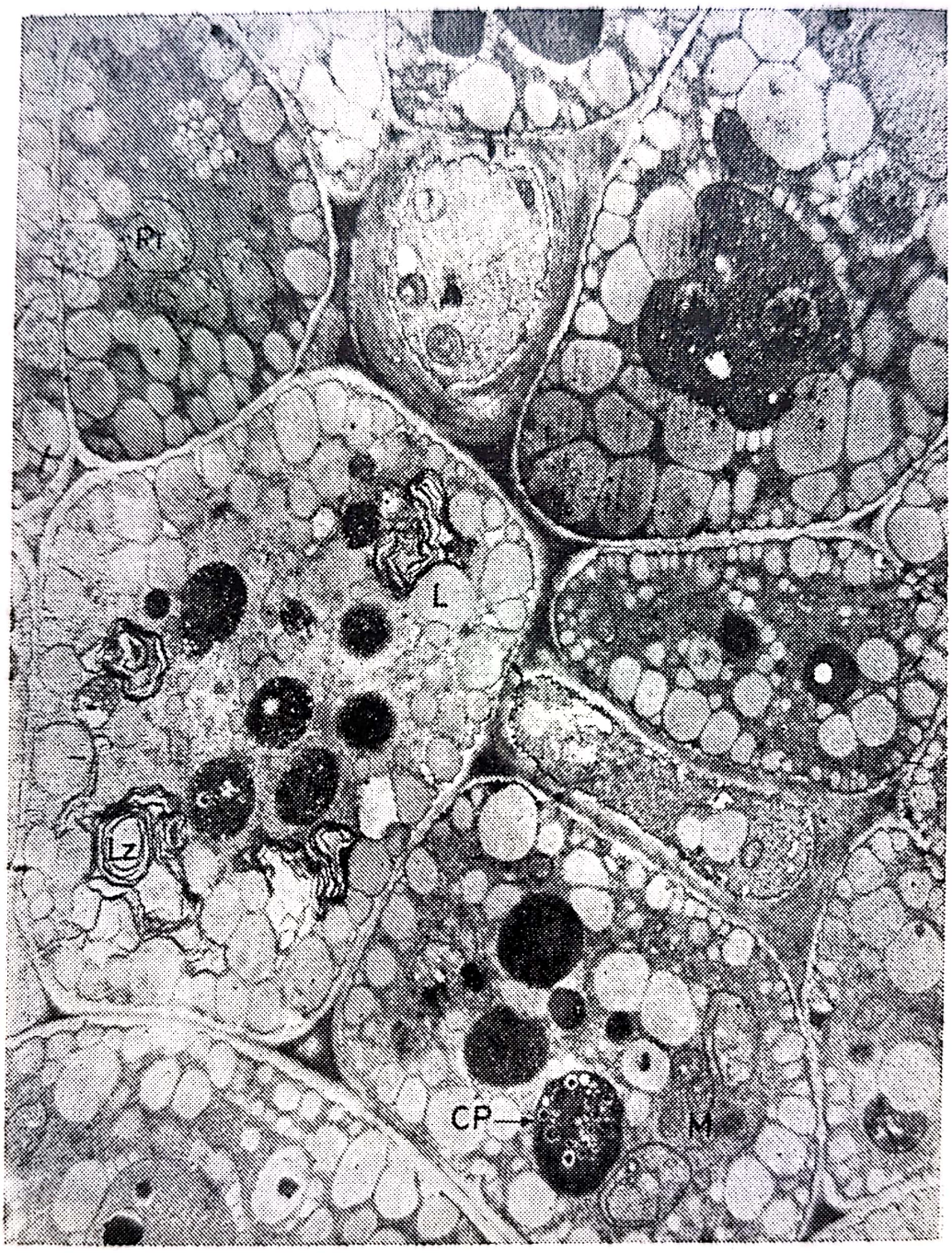
1 — epiderm; *2* — strat papilar; *3* — corpusculul lui Meissner; *a* — celule conjunctive; *b* — fibră nervoasă; *c* — celule ale capsulei conjunctive.

Scanned with OKEN Scanner



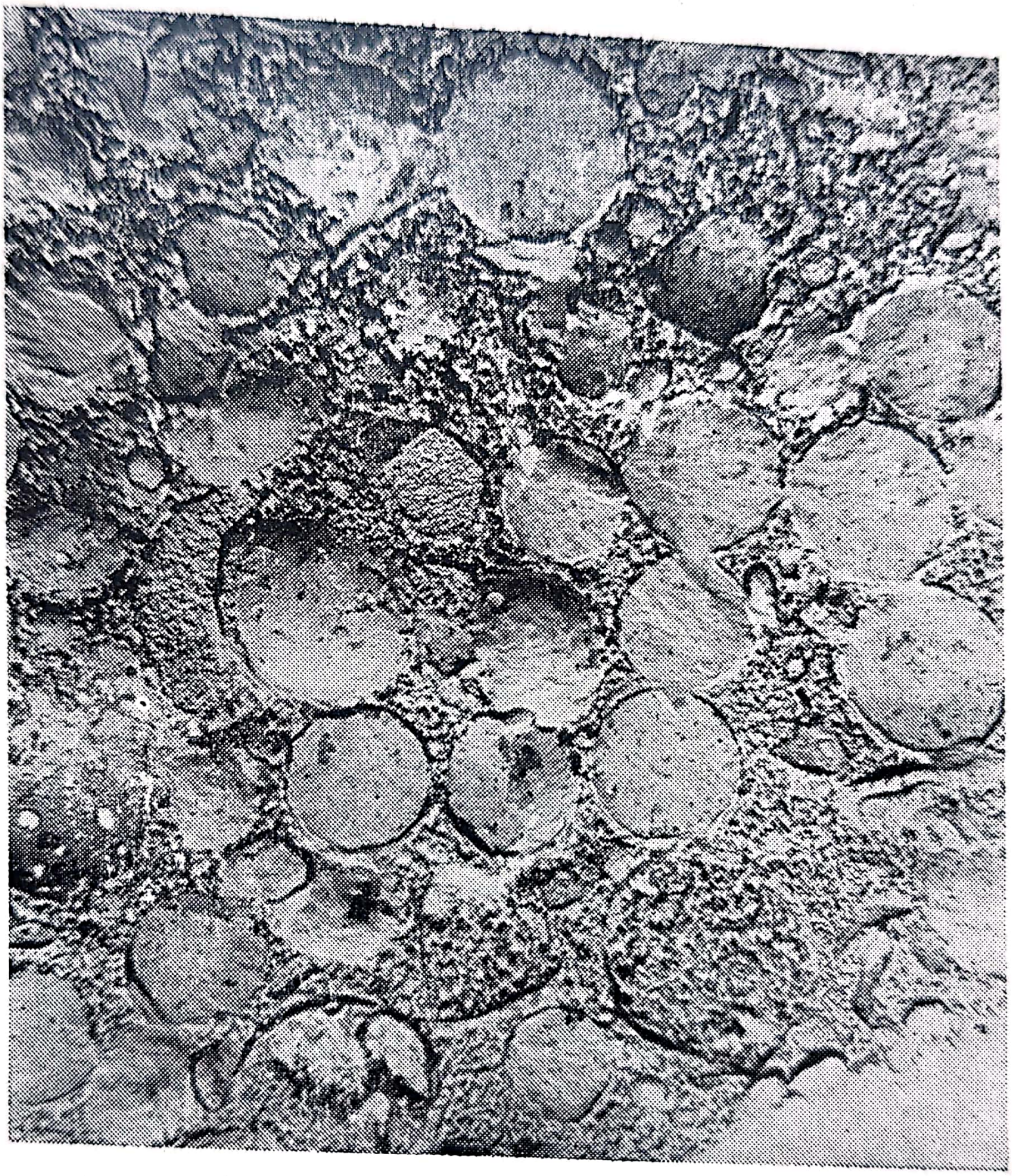
Planșa XI. Ultrastructura celulei la Euglema terricola:
E — endozom; *mn* — membrană nucleară; *Cr* — cromozom; *Cl* — cloroplast; *M* — mitocondrie (foto L. Gavrilă și F. Tăcină 1977, X 26000.

Scanned with OKEN Scanner



Planșa XII. Ultrastructura țesutului cotiledonar de la Abutilon theophrasti (foto A. Brezeanu).

Scanned with OKEN Scanner



Planșa XIII. Ultrastructura oogonului de la Achlya bisexualis (după N. Toma).

Scanned with OKEN Scanner

Lei 8

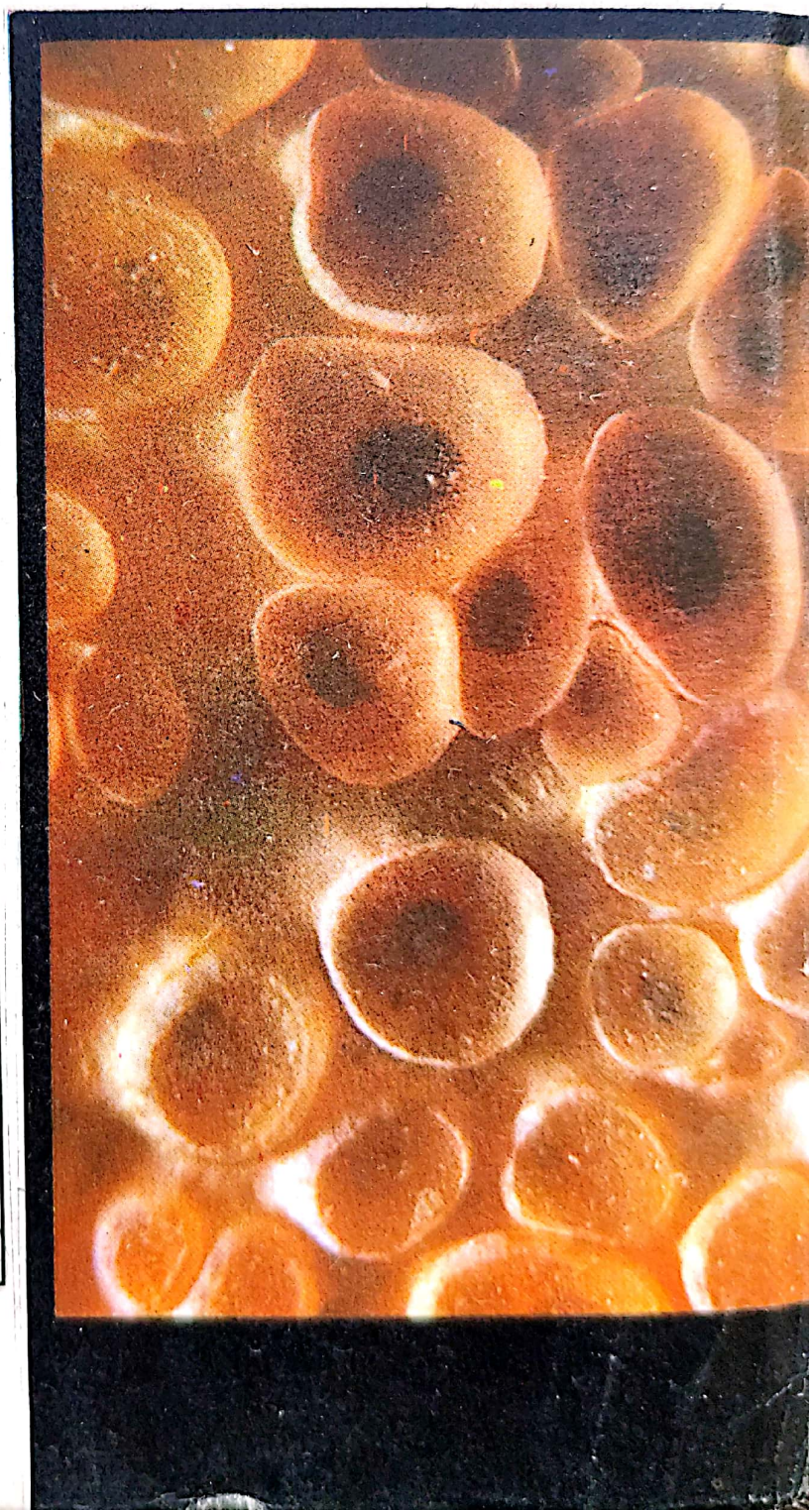
Editura tehnică

În tematica FOTO-FILM vor apărea :

Mihail Musceleanu,
FORMATUL SUPER 8.

Iosif Gheție,
ELECTRONICA ÎN FOTOGRAFIE.

Alexandru Marin,
TRUCAJE CINEMATOGRAFICE.



Scanned with OKEN Scanner